

Funktionelle Analyse des *Ustilago maydis* Effektorproteins Tin3 im Gencluster 19A



Dissertation

zur

**Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)**

Dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Nina Neidig

aus Nieder-Kinzig

Marburg/Lahn, 2013

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden von September 2009 bis Februar 2013 unter Betreuung von Frau Prof. Dr. Regine Kahmann in Marburg am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in der Abteilung Organismische Interaktionen durchgeführt.

Vom Fachbereich
der Philipps-Universität Marburg als Dissertation
angenommen am: 29.04.2013

Erstgutachter: Frau Prof. Dr. Regine Kahmann
Zweitgutachter: Herr Prof. Dr. Martin Thanbichler

Tag der mündlichen Prüfung: 06.05.2013

Teile dieser Arbeit werden in folgenden Artikeln veröffentlicht:

Brefort, T., Neidig, N., Tanaka, S., Kahmann, R. (2013). Deletion of cluster 19A leads to an endophytic life style of *Ustilago maydis*. (in Arbeit)

Neidig, N., Brefort, T., Kahmann, R. (2013). A Dual Function Effector of *Ustilago maydis*. (in Arbeit)

Bisherige Veröffentlichungen:

Neidig, N., Jousset, A., Nunes, F., Bonkowski, M., Paul, R. J., Scheu, S. (2010). Interference between bacterial feeding nematodes and amoeba relies on innate and inducible mutual toxicity. *Functional Ecology* **24**:1133-1138.

Neidig, N., Paul, R. J., Scheu, S., Jousset, A. (2011). Secondary metabolites of *Pseudomonas fluorescens* CHA0 drive complex non-trophic interactions with bacterivorous nematodes. *Environmental Microbiology* **61**:853-859.

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel „Funktionelle Analyse des *Ustilago maydis* Effektorproteins Tin3 im Gencluster 19A“ selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfsmittel bedient habe.

Diese Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 05.03.2013

Nina Neidig

„Ein Gelehrter in seinem Laboratorium ist nicht nur ein Techniker; er steht auch vor den Naturgesetzen wie ein Kind vor der Märchenwelt.“

Marie Curie (1867-1934)

Zusammenfassung

U. maydis ist ein pilzliches Pflanzenpathogen, das in Mais den sogenannten Maisbeulenbrand auslöst. Die pathogene Entwicklung aller Brandpilze ist an die sexuelle Entwicklung gekoppelt, die durch die Fusion zweier haploider Zellen mit unterschiedlichen Paarungstypen initiiert wird (Bölker *et al.*, 1992). Dies führt zur Bildung eines dikaryotischen Filaments, welches in der Lage ist, Pflanzenzellen mittels spezieller Infektionsstrukturen, den Appressorien, zu penetrieren (Feldbrügge *et al.*, 2004). Während dieses Prozesses wird die Plasmamembran des Wirtes eingestülpt und umhüllt die Pilzhyphe. Dies erzeugt eine spezielle Interaktionszone zwischen Pflanze und Pilz. Biotrophe Pathogene wie *U. maydis* sind vom Überleben der Wirtspflanze abhängig. Aus diesem Grund ist es essenziell für das Pathogen Erkennung durch das Pflanzenimmunsystem zu vermeiden oder zu unterdrücken, um eine kompatible Interaktion zu etablieren (Doehlemann *et al.*, 2008b). Um diese biotrophe Interaktion mit seiner Wirtspflanze aufzubauen ist *U. maydis* auf eine Vielzahl von sekretierten Proteinen angewiesen.

In dieser Arbeit wurde der *U. maydis* Effektor Tin3 charakterisiert, der signifikant an der Tumorbildung beteiligt ist und der in Hefe Zwei-Hybrid-Analysen mit einer pflanzlichen Cysteinprotease und dem pflanzlichen Autophagieprotein Beclin1 interagiert (T. Brefort, pers. Mitteilung). Expressionsstudien zeigten, dass *tin3* stark und spezifisch während der biotrophen Phase hochreguliert wird. Funktionelle Studien offenbarten eine duale Funktion von Tin3, die über die Interaktion mit zwei Maisproteinen vollzogen wird. Nach der Sekretion in die apoplastische Interaktionszone inhibiert Tin3 sekretierte Mais Cysteinproteasen. *In vitro* Protease-Aktivitätstests in Kombination mit *in vivo* Studien zeigen, dass Tin3 in der Lage ist die Cysteinprotease Mir3 und nahe verwandte Proteasen durch Bindung im aktiven Zentrum zu inhibieren. Die biologische Relevanz der Proteaseinhibition durch Tin3 zeigte sich in Versuchen, in denen es gelang den Virulenzphänotyp der *tin3* Mutante partiell durch Proteaseinhibitoren zu erreichen. Des Weiteren konnte eine zweite Funktion von Tin3 als Autophagie-Repressor postuliert werden, die durch Hefe-Assays und *in planta* Autophagosomen-Färbungen entdeckt wurde. Die Expression von vier pflanzlichen Autophagiegenen war nach Deletion von *tin3* induziert, ein Befund der die Inhibition der Autophagie durch Tin3 unterstützte. H₂O₂ Akkumulationen in Infektionen mit der *tin3* Deletionsmutante deuten an, dass der Tin3 Effektor pflanzliche Abwehrreaktionen durch seine duale Funktion aktiv unterdrückt und deshalb für die Etablierung der Biotrophie benötigt wird.

Summary

Ustilago maydis is a fungal plant pathogen, which causes smut disease in maize. The pathogenic development of all smut fungi is coupled to sexual development, which is initiated by the fusion of two compatible haploid cells with different mating types (Bölker *et al.*, 1992). This leads to the formation of a dicaryotic filament that is able to penetrate plant cells with a special infection structure called appressorium (Feldbrügge *et al.*, 2004). During this process the host plasma membrane invaginates and encases the fungal hyphae. A special interacting zone between plant and fungus is created. Biotrophic pathogens like *U. maydis* are dependent on the survival of their host plants. Therefore, it is essential for the pathogen to avoid or suppress recognition by the plant immune system in order to establish a compatible interaction (Doehlemann *et al.*, 2008b). To accomplish this interaction with its host plant *U. maydis* depends on a variety of novel secreted proteins.

In this study the *U. maydis* effector Tin3 was characterised that contributes significantly to tumor formation and interacts with a plant cysteine protease and the plant autophagy protein Beclin1 in yeast two-hybrid-assays. Expression studies showed that *tin3* is highly and specifically upregulated during the biotrophic phase. Functional studies revealed a dual function of Tin3 via interaction with two maize proteins. After secretion of Tin3 into the apoplastic interaction zone it inhibits defense related secreted maize cysteine proteases. *In vitro* protease activity assays combined with *in vivo* studies showed that Tin3 is able to inhibit cysteine protease Mir3 and closely related proteases via binding to the active site. The biological relevance of this function was shown in experiments that were able to partially complement the virulence phenotype of the *tin3* mutant by protease inhibitors. Furthermore, a second function of Tin3 as autophagy repressor could be postulated, which was revealed by a yeast assay and *in planta* stainings of autophagosomes. Expression of four plant autophagy genes was induced after deletion of *tin3*, a finding that supports inhibition of autophagy by Tin3. H₂O₂ accumulations in infections with the *tin3* deletion mutant indicated that the Tin3 effector actively participates in suppression of plant defense responses via its dual function and is therefore needed during the establishment of biotrophy.

Abkürzungen und Fachbegriffe

aa	„amino acid(s)“	M	Molar (g/L)
Abb.	Abbildung	MAMP	„microbe-associated molecular pattern“
ad	zum Endvolumen auffüllen		
bp	Basenpaar(e)	min	Minuten
BSA	„bovine serum albumin“	mM	Millimolar (mg/L)
bzw.	beziehungsweise	NB	„nucleotide binding“
Cbx	Carboxin	N-terminal	aminoterminal
cDNA	„complementary“ DNA	OD ₆₀₀	optische dichte bei 600 nm
CM	„complete medium“	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
C-terminal	carboxyterminal		
CW	Calcofluor white	PAMP	„Pathogen-associated molecular pattern“
Δ	Deletion		
de novo	von neuem	PCR	„polymerase chain reaction“
DIC	„differential interference contrast“	PD	„potato dextrose“
		PI	Propidium Iodid
DNA	Desoxyribonukleinsäure	<i>ppi</i>	Peptidylpropyl Isomerase
dpi	„days post infection“	PRR	„pattern recognition receptor“
DMSO	Dimethylsulfoxid	PTI	„PAMP-triggered immunity“
ETI	„effector-triggered immunity“	qPCR	quantitative „real-time“ PCR
ETS	„effector-triggered susceptibility“	R	„reverse“
F	„forward“	RNA	Ribonukleinsäure
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	ROS	„reactive oxygen species“
		RT	Raumtemperatur
GFP	„green fluorescent protein“	s	Sekunden
h	Stunde(n)	SDS	„sodium dodecyl sulfate“
H ₂ O _{bid.}	zweifach destilliertes Wasser	Tris	Trishydroxymethyl-aminomethan
hpi	„hours post infection“	U	Units (Enzymaktivität)
HR	„hypersensitive response“	Upm	Umdrehungen pro Minute
<i>in planta</i>	innerhalb des Pflanzengewebes	vgl.	vergleiche
<i>ip</i>	„iron-sulphur protein“	WGA	„wheat germ agglutinin“
kb	Kilobasenpaar(e)	WT	Wildtyp
kD	Kilodalton	z.B.	zum Beispiel
LRR	„leucine rich repeat“		

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG.....	I
SUMMARY.....	II
ABKÜRZUNGEN UND FACHBEGRIFFE	III
INHALTSVERZEICHNIS	IV
1 EINLEITUNG	1
1.1 Das pflanzliche Immunsystem.....	1
1.1.1 Cysteinproteasen und ihre Rolle in der Pflanzenabwehr	5
1.1.2 Autophagie und ihre Rolle in der Pflanzenabwehr	8
1.2 <i>Ustilago maydis</i> – Der Erreger des Maisbeulenbrandes.....	11
1.2.1 Der Lebenszyklus von <i>U. maydis</i>	11
1.2.2 Sekretierte Effektoren von <i>U. maydis</i>	14
1.3 Fragestellung dieser Arbeit.....	17
2 ERGEBNISSE	18
2.1 Sequenzvergleich des Tin3 Effektorproteins.....	18
2.2 Expression von <i>tin3</i> wird spezifisch während der biotrophen Phase induziert	19
2.3 Tin3 wird von <i>U. maydis</i> in den Apoplasten von Maiszellen sekretiert.....	20
2.4 Phänotypische Charakterisierung der SG200 Δ <i>tin3</i> Deletionsmutante	21
2.4.1 Tin3 spielt keine Rolle während der saprophytischen Phase von <i>U. maydis</i>	22
2.4.2 Die Rolle von Tin3 während der pathogenen Entwicklung von <i>U. maydis</i>	23
2.5 Tin3 interagiert mit zwei Maisproteinen	25
2.6 Heterologe Expression und Aufreinigung von Tin3.....	27
2.7 Heterologe Expression und Aufreinigung von Mir3 und CP1A	28
2.8 Das Effektorprotein Tin3 als Proteaseinhibitor	30
2.8.1 Tin3 inhibiert die Cysteinprotease Mir3	31
2.8.2 Tin3 ist kein Substrat der Cysteinprotease Mir3.....	32
2.8.3 Tin3 inhibiert die Cysteinprotease CP1A und interagiert mit weiteren Maisproteasen	32
2.8.4 Tin3 inhibiert Proteasen in Pflanzenlysaten infizierter Maisblätter.....	35
2.8.5 Tin3 inhibiert Abwehr-induzierte apoplastische Cysteinproteasen	36
2.8.6 Tin3 inhibiert Cysteinproteasen durch Bindung an das aktive Zentrum	38
2.8.7 Identifizierung der Tin3-Inhibitor-domäne	39

2.8.8	Die Proteaseinhibitor-Funktion von Tin3 wird für die Virulenz benötigt	41
2.9	Effektorprotein Tin3 als Autophagie-Inhibitor	43
2.9.1	Der konservierte Bereich von Tin3 interagiert mit dem Autophagie-Protein Beclin1	44
2.9.2	Pflanzliche Autophagie-Gene sind in SG200 Δ tin3-infizierten Maisblättern induziert	47
2.9.3	In SG200 Δ tin3 infizierten Pflanzen wird eine Akkumulation von Autophagosomen beobachtet	48
2.10	Infektionen mit SG200 Δ tin3 zeigen deutliche H ₂ O ₂ -Akkumulationen	50
2.11	Tin3 Prozessierung	51
3	DISKUSSION	53
3.1	Tin3 wird während der biotrophen Entwicklung von <i>U. maydis</i> induziert und sekretiert	53
3.2	Tin3 ist für die Virulenz von <i>U. maydis</i> notwendig	54
3.3	Tin3 inhibiert die pflanzlichen Cysteinproteasen Mir3 und CP1A <i>in vitro</i>	55
3.4	Tin3 ist wichtig für die Inhibition von Abwehr-induzierten apoplastischen Cysteinproteasen in Mais	56
3.5	Tin3 inhibiert Cysteinproteasen der C1A Familie durch die Bindung an das aktive Zentrum	57
3.6	Die Virulenz von <i>U. maydis</i> ist abhängig von der Proteaseinhibitor-Funktion von Tin3	59
3.7	Die konservierte Domäne von Tin3 vermittelt die Interaktion mit Autophagieprotein Beclin1	60
3.8	Tin3 inhibiert Autophagie <i>in vivo</i>	61
3.9	Tin3 unterdrückt das pflanzliche Immunsystem	63
4	MATERIAL UND METHODEN	67
4.1	Material und Bezugsquellen	67
4.1.1	Chemikalien	67
4.1.2	Puffer und Lösungen	67
4.1.3	Enzyme und Antikörper	67
4.1.4	Verwendete Kits	68
4.2	Zellkultivierung	68
4.2.1	Kultivierung von <i>E. coli</i> und <i>A. tumefaciens</i>	68
4.2.2	Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	69
4.2.3	<i>P. pastoris</i>	70
4.2.4	Kultivierung von <i>U. maydis</i>	70
4.2.5	Bestimmung der Zelldichte	72
4.3	Stämme, Oligonukleotide und Plasmide	73
4.3.1	<i>E. coli</i> Stämme	73
4.3.2	<i>A. tumefaciens</i> Stämme	73

4.3.3	<i>S. cerevisiae</i> Stämme	74
4.3.4	<i>U. maydis</i> Stämme	74
4.3.5	Oligonukleotide	75
4.3.6	Plasmide	80
4.4	Mikrobiologische Methoden	86
4.4.1	<i>E. coli</i> und <i>A. tumefaciens</i>	86
4.4.2	<i>U. maydis</i> , <i>S. cerevisiae</i> und <i>P. pastoris</i>	89
4.5	Molekularbiologische Methoden	91
4.5.1	<i>In vitro</i> Modifikationen von Nukleinsäuren	91
4.5.2	Isolierung von Nukleinsäuren	93
4.5.3	Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäuren	95
4.6	Biochemische Methoden	98
4.6.1	Gewinnung von Proteinextrakten	98
4.6.2	Heterologe Proteinexpression und Reinigung	102
4.6.3	Auftrennung und Nachweis von Proteinen	104
4.6.4	Immunpräzipitation von HA-fusionierten Proteinen aus infiziertem Maisgewebe	107
4.6.5	Protease-Aktivitätstests	108
4.6.6	Assay zur Untersuchung der Proteolytischen Spaltung von Tin3 durch Mir3	109
4.6.7	Assay zur Untersuchung einer möglichen Prozessierung von Tin3	110
4.6.8	Hefe Zwei-Hybrid-Systeme	110
4.6.9	Hefe-Autophagie-Assay	111
4.7	Pflanzenmethoden	111
4.7.1	<i>Zea mays</i>	111
4.7.2	<i>Nicotiana benthamiana</i>	112
4.8	Färbungen und Mikroskopie	113
4.8.1	Färbemethoden	113
4.8.2	Mikroskopie und Bildverarbeitung	115
4.9	Bioinformatische Methoden	116
5	LITERATUR	117
6	ANHANG	125

1 Einleitung

Phytopathogene Pilze haben in ihrer Evolution unterschiedliche Strategien entwickelt ihre Wirtspflanzen zu besiedeln. Biotrophe Pilze sind dabei auf das lebende Pflanzengewebe ihrer Wirtspflanzen angewiesen, um ihren Lebenszyklus vollständig zu durchlaufen und mit Nährstoffen versorgt zu werden (Lewis, 1973). Die Verbindung zwischen Pilz und Pflanze reicht hierbei von mutualistischen Beziehungen, wie im Falle der arbuskulären Mykorrhiza, bis hin zu vollständig parasitischen Formen, wie im Falle der Rostpilze und dem Echten Mehltau (O'Connell *et al.*, 2006). Die erfolgreiche Umprogrammierung des pflanzlichen Metabolismus sowie die Unterdrückung von Abwehrreaktionen der Pflanze durch den pathogenen Pilz sind dabei essenziell für die Etablierung der biotrophen Interaktion (Dangl, 1995; Jones *et al.*, 2006; Dodds *et al.*, 2010).

1.1 Das pflanzliche Immunsystem

Pflanzen sind sessile Organismen, die in ihrem natürlichen Umfeld kontinuierlich den Angriffen von potenziellen Pathogenen wie Viren, Bakterien, Pilzen und Oomyceten sowie Insekten und Nematoden ausgesetzt sind. Grundsätzlich besitzen Pflanzen bestehende und induzierbare physische Barrieren, wie die wachsartige Cuticula und die Pflanzenzellwand, die als erster Schutz gegen Pathogene dienen (Koeck *et al.*, 2011). Zellwandeinlagerungen wie Kallose, Lignin oder Suberin sowie die Vernetzung von Zellwandproteinen können als zusätzlicher Schutz induziert werden (Perez-de-Luque *et al.*, 2007; Perez-de-Luque *et al.*, 2008). Des Weiteren produzieren Pflanzen antimikrobielle Stoffe wie zum Beispiel phenolische Substanzen, Phytoalexine (Baidez *et al.*, 2007) und Defensine (Zasloff, 2002), die ebenfalls dem Eindringen der Erreger entgegen wirken. Im Gegensatz zu Tieren besitzen Pflanzen weder ein adaptives Immunsystem noch bewegliche Abwehrzellen (Martinon *et al.*, 2005; Vivier *et al.*, 2005). Aus diesem Grund haben Pflanzen ein zweischichtiges, basales Immunsystem für die Abwehr von Pathogenen entwickelt, welches auf der Immunantwort des angegriffenen Gewebes basiert.

Die erste Phase der Immunantwort (primäre basale Immunität) wird durch die Erkennung von essenziellen Pathogen-spezifischen Strukturen, sogenannte MAMPs oder PAMPs (microbial-/pathogen-associated molecular patterns), wie beispielsweise Flagellin und Lipopolysaccharide von Bakterien sowie Chitin und β -Glucan von Pilzen und Oomyceten

vermittelt (Nürnberg *et al.*, 2004; Zipfel *et al.*, 2005). Die Erkennung dieser Strukturen erfolgt über spezifische PRR-Rezeptoren (pattern recognition receptors) und induziert die erste Stufe der Abwehrreaktionen. Zu diesen Reaktionen gehören Zellwandveränderungen und die Akkumulation von Abwehrproteinen wie Chitinasen, Glucanasen und Proteasen (van Loon *et al.*, 2006) sowie die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies wie H_2O_2 , die sich alle negativ auf die Ausbreitung potenzieller Pathogene auswirken. Zusammen führen diese Reaktionen zu einer PAMP-induzierten Immunität (PTI; Abb. 1) und damit zu einer Interaktion, in der der Wirt die Besiedlung durch das Pathogen erfolgreich abwehrt (Staskawicz *et al.*, 1995; Jones *et al.*, 2006).

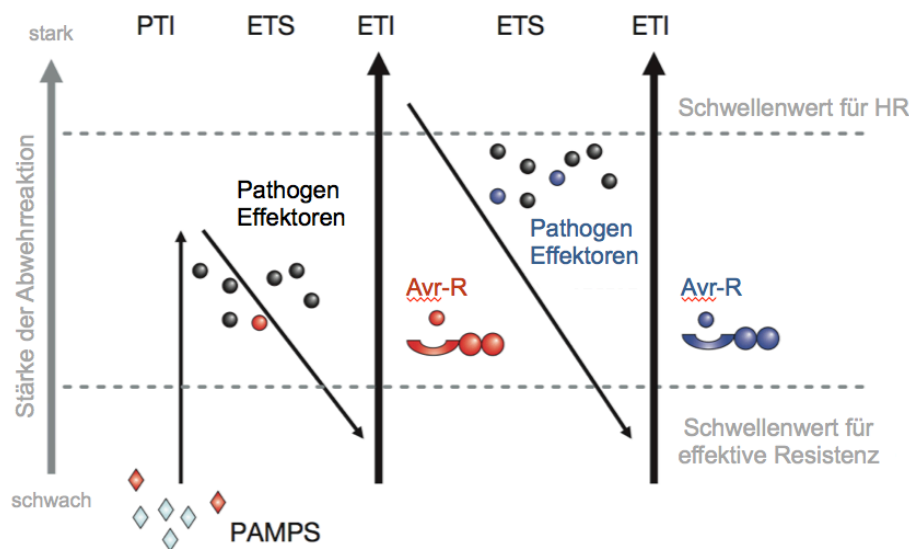


Abb. 1: **Das Model zeigt den quantitativen Output des pflanzlichen Immunsystems.** In Phase 1 detektieren Pflanzen MAMPs oder PAMPs (rote Rauten) über PRRs, um die PAMP-induzierte Immunität (PTI) auszulösen. In Phase 2 sekretieren erfolgreiche Pathogene Effektoren, die mit PTI interferieren oder die Ernährung und Verbreitung des Pathogens sicherstellen. Dies führt wiederum zur Effektor-induzierten Suszeptibilität (ETS) der Pflanze. In Phase 3 wird ein Effektor (rote Kugel) durch ein NB-LRR Protein erkannt, was die Effektor-induzierte Immunität (ETI) hervorruft. Diese Immunität ist eine verstärkte Version der PTI, die den Grenzwert zur Auslösung des hypersensitiven Zelltods (HR) überschreitet. In Phase 4 treten Pathogenisolate auf, die den roten Effektor verloren haben, dafür aber einen neuen Effektor durch horizontalen Gentransfer erlangt haben, der eventuell wieder ETI unterdrücken kann. Pflanzen, die NB-LRR Protein besitzen, die diesen Effektor erkennen können, zeigen wieder ETI. Die Abbildung wurde nach Jones *et al.* (2006) verändert.

Erfolgreiche Pathogene können diese basalen Abwehrreaktionen unterdrücken und haben für diesen Zweck anspruchsvolle Mechanismen entwickelt, die zur Effektor-induzierten Suszeptibilität (ETS) der Pflanze führen (Abb. 1; Vivier *et al.*, 2005). Für Bakterien wie zum Beispiel *Pseudomonas syringae* wurde gezeigt, dass Effektorproteine mittels Typ III Sekretionssystem in das Zytoplasma infizierter Pflanzen injiziert und hierüber dann die primären Abwehrmechanismen unterdrückt werden (Jakobek *et al.*, 1993; Grant *et al.*,

2006b). Viele dieser Effektoren interferieren mit den PRRs oder speißen in die Abwehr-Signaltransduktionskaskaden ein (Xiang *et al.*, 2011). Auch AvrPto, einer der am besten untersuchten Effektoren von *P. syringae*, stört die durch das bakterielle Flagellin (flg22) ausgelöste Signalweiterleitung und inhibiert auf diese Weise direkt PTI (Xiang *et al.*, 2008). Pathogene Nematoden injizieren Effektoren über ihr Stylet in den Apoplasten oder direkt in das Cytosol der Pflanzenzellen (Vieira *et al.*, 2011). Im Vergleich zu bakteriellen Effektoren ist die Wirkungsweise der Effektoren von Pilzen und Oomyceten weniger gut untersucht. Dennoch konnte bereits gezeigt werden, dass auch filamentöse Pathogene ihre Effektoren in den pflanzlichen Apoplasten sekretieren oder in die Pflanzenzelle abgeben, um auf diese Weise Abwehrreaktionen zu unterdrücken, in Signalwege des Immunsystems einzugreifen oder den Wirtsmetabolismus zu reprogrammieren (Kamoun, 2009; Panstruga *et al.*, 2009; Dodds *et al.*, 2010). Der Reisbrand Erreger *Magnaporthe oryzae* beispielsweise vermeidet die Pflanzenabwehr durch die Sekretion des LysM Effektors Slp1, der die Chitin-induzierte Immunität unterdrückt (Mentlak *et al.*, 2012). Ähnliche Funktionen wurden für zwei Effektoren von *Cladosporium fulvum*, dem Erreger der Braunfleckenkrankheit bei Tomaten, gezeigt. Avr4 und Ecp6 binden das Chitin der pilzlichen Zellwand und verhindern so die Produktion von PAMPs durch pflanzliche Chitinasen und damit die Erkennung durch die Pflanze (de Jonge *et al.*, 2011).

Da Pflanzen kein adaptives Immunsystem besitzen, haben sie eine zweite Stufe von Abwehrreaktionen (sekundäre Immunität) entwickelt. Dies schützt sie gegen Pathogene, welche die primäre Immunantwort der Pflanzenzelle unterdrückt haben und in die Zelle eindringen konnten (Jones *et al.*, 2006). Durch die intrazelluläre Erkennung von PTI-unterdrückenden Effektoren entwickeln Pflanzen eine Effektor-induzierte Immunität (ETI; Abb. 1). Dabei werden Effektoren meist durch eine Klasse von Rezeptoren erkannt, die Nukleotid-Bindedomänen und Leucin-reiche Wiederholungen (LRRs) besitzen und auch als Resistenz (R) Proteine bezeichnet werden; die erkannten Effektoren werden Avirulenzproteine (Avr) genannt (Jones *et al.*, 2006; Dodds *et al.*, 2010). ETI ist eine verstärkte und schnellere Version von PTI, die meist neben Zellwandeinlagerungen und der Produktion von antimikrobiellen Stoffen zu einer starken Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und zur Induktion von lokalem Zelltod (hypersensitive Reaktion, HR) führt (Jones *et al.*, 2006; Doehlemann *et al.*, 2008a). Die Erkennung der Effektoren kann hierbei entweder direkt durch physischen Kontakt oder auch indirekt stattfinden. Zwischen dem NB-LRR Pi-ta Rezeptor aus Reis und dem *Magnaporthe grisea* Effektor AvrPita besteht beispielsweise eine direkte Interaktion (Jia *et al.*, 2000). Indirekte Effekte,

bei denen Effektor-induzierte Störungen indirekt durch R-Proteine wahrgenommen werden, treten im Vergleich allerdings häufiger auf. Dieses Phänomen wird auch als „Guard-Model“ bezeichnet (van der Biezen *et al.*, 1998; van der Hoorn *et al.*, 2002). Als Beispiel für eine solche Erkennung kann das RIN4 Protein von *Arabidopsis thaliana* genannt werden, welches das Ziel von drei bakteriellen Effektoren (AvrRpm1, AvrB und AvrRpt2) ist und von zwei R Proteinen (RPM1 und RPS2) überwacht wird (Mackey *et al.*, 2002). Da solche Zielproteine einem hohen Selektionsdruck ausgesetzt sind, geht man in neueren Studien von einer sogenannten „Decoy-Hypothese“ aus, bei der die Pflanzen im Verlauf der Evolution neben dem Zielprotein Duplikationen oder neu entstandene Proteine mit gleicher Funktion anreichern, die das eigentliche Zielprotein maskieren (van der Hoorn *et al.*, 2008). Ein zusätzlicher Mechanismus zum Schutz vor Pflanzenpathogenen ist die sogenannte systemische Resistenz. Diese wird ebenfalls durch Pathogenbefall ausgelöst und tritt zusammen mit der lokalen primären und sekundären Immunität auf, aber in Bereichen die von der Infektionsstelle weiter entfernt sind (Grant *et al.*, 2006a). Die systemische Resistenz der Pflanze hängt stark von der Wirkung unterschiedlicher Pflanzenhormone, wie Salicylsäure (SA), Jasmonsäure (JA), Ethylen (ET), Abscisinsäure (ABA) oder Kombinationen dieser ab. Die Art des Pflanzenpathogens bestimmt hierbei die Art der systemischen Resistenz, so lösen biotrophe und nekrotrophe Pathogene unterschiedliche Arten der induzierten Resistenz aus, die durch unterschiedliche Pflanzenhormone reguliert werden (Glazebrook, 2005).

Die Co-Evolution von Pathogen und Wirt beziehungsweise von R-Proteinen und Avr-Proteinen führt zu einem Wettstreit (Birch *et al.*, 2006), der für Pathogen-Varianten selektiert, die Effektoren besitzen, die nicht durch NB-LRR Rezeptoren erkannt werden können (Abb. 1). Um der sekundären Immunität der Pflanze (ETI) aktiv zu entgehen, können Pathogene sich anpassen, indem sie z. B. das Gen für den erkannten Effektor mutieren oder die Evolution eines neuen Effektors einleiten, welcher der Erkennung des anderen entgegenwirkt (Chisholm *et al.*, 2006; Jones *et al.*, 2006; de Wit, 2007). Beispiel für einen Effektor der ETI schwächen oder inhibieren kann ist AvrPtoB, ein *Pseudomonas* Typ III Effektor, der die Suszeptibilität der Pflanze durch die Inhibition des programmierten Zelltods vermittelt (Abramovitch *et al.*, 2003).

1.1.1 Cysteinproteasen und ihre Rolle in der Pflanzenabwehr

Generell besitzen Pflanzen hunderte von Proteasen, die vielfältige biologische Prozesse regulieren. Neben Wachstums- und Entwicklungsprozessen wie Meiose, Seneszenz, Stomata Entwicklung oder die Akkumulation/Mobilisierung von Speicherproteinen haben Proteasen auch Schlüsselrollen in der Erkennung von Pathogenen und der Induktion von Abwehrreaktionen und Signaltransduktionen (van der Hoorn, 2008). Gerade wegen dieser Vielfalt sind die pflanzlichen Proteasen substratspezifisch und sehr streng reguliert, sowohl zeitlich als auch räumlich (van der Hoorn, 2008). Im Allgemeinen werden Proteasen in Endopeptidasen, die interne Peptidbindungen spalten, und Amino- und Carboxypeptidasen, die N-terminale bzw. C-terminale Peptidbindungen spalten, gegliedert. Aufgrund ihres Wirkmechanismus lassen sich Proteasen in vier katalytische Gruppen einteilen: Serinproteasen, Cysteinproteasen, Aspartatproteasen und Metalloproteasen.

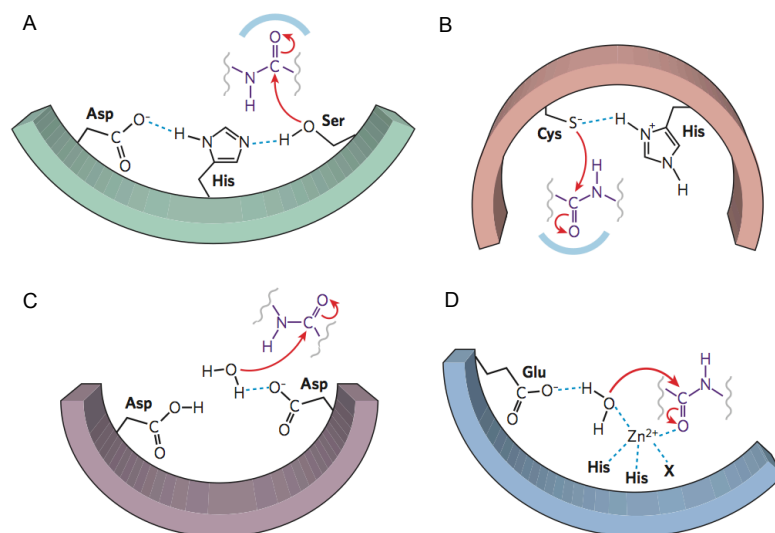


Abb. 2: **Spaltmechanismen der vier katalytischen Proteaseklassen.** **A** Die katalytische Triade im aktiven Zentrum von Serinproteasen besteht aus Histidin, Serin und Asparaginsäure. Während der Spaltreaktion deprotoniert das Histidin die Hydroxylgruppe des Serin mit Hilfe der Asparaginsäure und bildet so das Nukleophil. Gleichzeitig wird die Carbonylgruppe der Peptidbindung durch die Stabilisierung des Sauerstoffatoms in der „Oxyanion-Höhle“ (blaue Kurve in A und B) polarisiert und ermöglicht so den nukleophilen Angriff und die Spaltung der Peptidbindung. **B** Der Mechanismus von Cysteinproteasen gleicht dem der Serinproteasen, nur bildet in diesem Fall das Schwefelatom des Cysteins im aktiven Zentrum das Nukleophil. **C** Aspartatproteasen aktivieren ein Wassermolekül (Entzug eines Protons) durch die Asparaginsäuren im aktiven Zentrum. Das polarisierte Wasser bildet hierbei das Nukleophil und greift die in diesem Fall ungeladene Carbonylgruppe an. **D** Metalloproteasen nutzen ein Metallion (z. B. Zink), um das Oxyanion zu stabilisieren. Das Glutamat des aktiven Zentrums aktiviert ein Wassermolekül, was wiederum als Nukleophil zur Spaltung der Peptidbindung dient. Die großen Kurven repräsentieren die Enzyme; rote Pfeile zeigen die Bewegung von Elektronenpaaren; blau gepunktete Linien stehen für Wasserstoffbrücken oder ähnliche elektrostatische Interaktionen; graue Linien zeigen die Weiterführung der Substrate. Abbildung verändert nach Erez *et al.* (2009).

Der grundlegende Prozess der Peptidspaltung ist dabei für alle Protease Klassen vergleichbar (Abb. 2). Die Proteasen polarisieren die Carbonylgruppe der Peptidbindung durch die Stabilisierung des Sauerstoffatoms in der „Oxyanion-Höhle“. Dadurch wird das Kohlenstoffatom der Carbonylgruppe für den Nukleophilen Angriff vorbereitet (van der Hoorn, 2008; Erez *et al.*, 2009).

Mögliche Rollen von Proteasen in der Pflanzenabwehr sind die Erkennung von Pathogenen, die Signalweiterleitung und die direkte Interaktion mit Angreifern. Eine Möglichkeit der Perzeption wäre hierbei die Beteiligung von Proteasen an der Freisetzung von Elicitoren (PAMPs), was die Erkennung des Pathogens zur Folge hätte (van der Hoorn *et al.*, 2004). Des Weiteren können Elicitoren inaktive Proteasen binden, sie dadurch aktivieren und weitere Signalkaskaden auslösen. Ein Beispiel hierfür ist eine Serinprotease (Factor C) von Pfeilschwanzkrebsen, die durch das Binden von Lipopolysacchariden aktiviert wird und zu einer proteolytischen Kaskade führt, die wiederum Abwehrreaktionen auslöst (Ariki *et al.*, 2004). Die dritte Möglichkeit der Perzeption wäre die Inhibition aktiver Proteasen. Hierbei könnte entweder der Protease-Inhibitor-Komplex selbst oder die veränderte Aktivität der Protease zu einer Signalweiterleitung oder Erkennung führen. Dieses Model konnte für Rcr3, eine sekretierte Cysteinprotease der Tomate, bestätigt werden. Rcr3 wird für die Funktion eines R-Proteins (Cf-2) benötigt, welches das Avr-Protein Avr2 von *C. fulvum* erkennt. Es wurde gezeigt, dass Avr2 die Cysteinprotease Rcr3 inhibieren kann. In resistenten Pflanzen dient Cf-2 als „Bewacher“ der Protease („Guard-Hypothese“) und um deren Inhibition zu detektieren und anschließend die Signalweiterleitung zu aktivieren (Krüger *et al.*, 2002; Rooney *et al.*, 2005). Interessanterweise wird die Cysteinprotease Rcr3 auch von den sekretierten Effektoren EPIC1 und EPIC2 des Oomyceten *Phytophthora infestans* inhibiert. Dies zeigt außerdem die unabhängige Entwicklung von Effektoren in phylogenetisch nicht verwandten Organismen, die das gleiche Wirts-Protein angreifen (Song *et al.*, 2009). Mögliche Funktionen von Proteasen in Signalkaskaden sind die Freisetzung von positiven oder der Abbau von negativen Regulatoren, wodurch Signalwege aktiviert werden können (van der Hoorn *et al.*, 2004). Beispielsweise aktiviert die sekretierte Serinprotease Psh von *Drosophila* den Toll-Signalweg nach Pilzinfektionen (Ligoxygakis *et al.*, 2002). Eine extrazelluläre Aspartatprotease (CDR1) von *A. thaliana* besitzt ebenfalls eine Funktion in der Signalweiterleitung, die die Resistenz gegen Pathogene zur Folge hat. Durch Überexpression dieser Protease gelang es, eine konstitutive Resistenz gegenüber Krankheiten zu vermitteln (Xia *et al.*, 2004).

Schließlich können Proteasen auch maßgeblich an der Ausführung der Abwehrreaktion beteiligt sein. Proteine von Pathogenen können dabei direkt von Proteasen degradiert werden, Toxine können freigesetzt oder Enzyme durch proteolytische Spaltung von ihren „Precursorproteinen“ aktiviert werden. Allgemein konnte gezeigt werden, dass vor allem Papain-ähnliche Cysteinproteasen Schlüsselfunktionen in der Pflanzenabwehr gegen Pathogene einnehmen (Shindo *et al.*, 2008). Papain selbst wurde in hohen Konzentrationen im Milchsaft verschiedener Pflanzen identifiziert und ist direkt für die Abwehr von Fressfeinden zuständig. Es konnte zum Beispiel in einem Versuch gezeigt werden, dass Papain toxisch für Seidenspinnerlarven ist. Die Larven starben, wenn sie Feigenblätter aßen, überlebten aber wenn der Milchsaft entfernt oder der Proteaseinhibitor E-64 hinzugegeben wurde (Konno *et al.*, 2003). E-64 inaktiviert Cysteinproteasen spezifisch und irreversibel durch die Bindung an das aktive Zentrum (Hanada *et al.*, 1978). Da die Inhibition der Proteasen bereits ausreichte, um die Suszeptibilität gegenüber Fressfeinden zu erhöhen, zeigt dieses Beispiel sehr deutlich, wie wichtig Proteasen für die Immunabwehr der Pflanze sind. Die Cysteinproteasen Mir1 – Mir3 wurden aus Mais isoliert und sind ebenfalls Proteasen, die an pflanzlichen Abwehrreaktionen beteiligt sind. Für Mir1 konnte bereits eine Rolle bei der direkten Abwehr von pflanzenfressenden Insekten gezeigt werden. Mir1 besitzt vermutlich selber eine toxische Wirkung und setzt vermutlich durch proteolytische Aktivität andere toxische Komponenten frei (Pechan *et al.*, 2000).

Die gezeigten Beispiele und unterschiedlichen Funktionen von Proteasen in der Pflanzenabwehr deuten an, wie wichtig diese Proteine für die Pflanze sind. Dementsprechend wichtig ist es für Pflanzenpathogene, diese Proteine zu inhibieren und in ihrer Funktion zu behindern. Wie schon an einigen Beispielen gezeigt, wirken viele sekretierte Effektorproteine als Proteaseinhibitor und unterdrücken auf diese Weise die Immunantwort der Pflanze oder reduzieren die Stärke der pflanzlichen Reaktion. Die Interaktion zwischen Proteasen und ihren Substraten und Inhibitoren kann als ein molekulares Schlachtfeld angesehen werden, in dem Pflanzen und Pathogene um die besten Waffen kämpfen (Shindo *et al.*, 2008).

1.1.2 Autophagie und ihre Rolle in der Pflanzenabwehr

Generell beschreibt Autophagie einen konservierten Mechanismus in eukaryotischen Zellen zur Degradation von Zellbestandteilen, Proteinen oder Organellen, der dazu dient Nährstoffe zu recyceln oder beschädigte und toxische Materialien abzubauen (Talbot *et al.*, 2009). Pflanzen verwenden Mechanismen der Autophagie vor allem für die Remobilisierung von Nährstoffen unter Zucker- oder Stickstoff-limitierenden Bedingungen, für die Blattseneszenz sowie generelle Wachstums und Entwicklungsprozesse (Bassham, 2007). Des Weiteren steht Autophagie im Zusammenhang mit Pathogenabwehr und dem pflanzlichen Immunsystem. In *Saccharomyces cerevisiae* wurde Autophagie am ausführlichsten untersucht. Dabei wurden in genetischen Studien 30 Autophagie (Atg) Gene identifiziert, die eine wichtige Rolle in den unterschiedlichen Typen von Autophagie spielen (Klionsky *et al.*, 2003; Levine *et al.*, 2004). Es wird zwischen Makroautophagie, Mikroautophagie und Chaperon-induzierter Autophagie unterschieden (Xie *et al.*, 2007). Makroautophagie ist die am häufigsten demonstrierte Form der Autophagie, die bereits vor 40 Jahren in Pflanzen beschrieben wurde (Matile *et al.*, 1971).

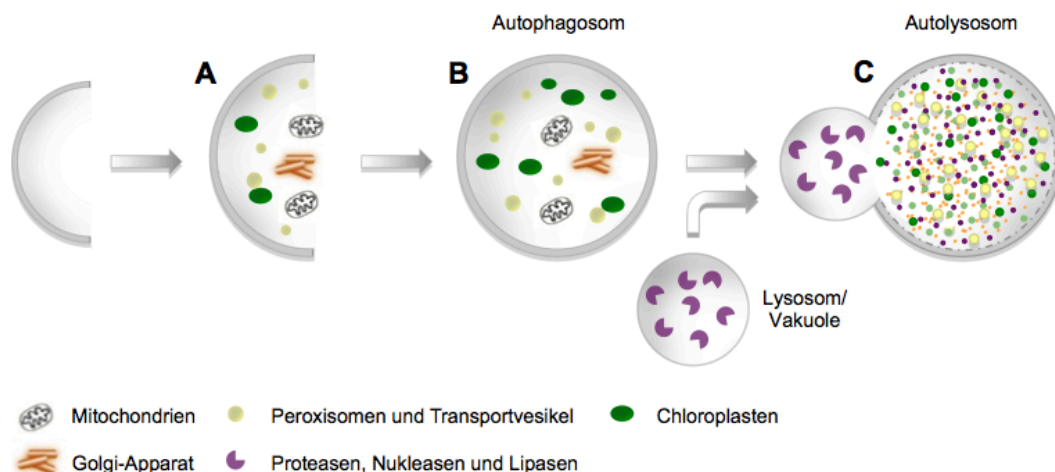


Abb. 3: **Schritte der Autophagosomenbildung (Makroautophagie).** Die halbmondförmige Isolationsmembran wird gebildet und umschließt einen Teil des Cytoplasmas, inklusive Zellorganellen und Proteinen (A). Nach der Verlängerung und Fusion der Membranen bildet sich das de novo synthetisierte Autophagosom mit typischer Doppelmembran (B). Die gebildeten Autophagosomen fusionieren anschließend mit Lysosomen oder Vakuolen, um die Degradierung der Zellbestandteile einzuleiten (C). Modifiziert nach He *et al.* (2010).

Dieser Prozess beinhaltet den Einschluss eines Teils des Cytoplasmas durch halbmondförmige Membranen unbekannten Ursprungs (Abb. 3 A; Bassham, 2007). Die

Membranen verlängern sich und fusionieren zu einem großen Vesikel mit Doppelmembran, dem Autophagosom (Seay *et al.*, 2006). Die Degradation des Vesikelinhalts erfolgt durch die Fusion der äußeren Autophagosomen-Membran mit Vakuolen oder Lysosomen und die Aufnahme der Zellbestandteile in das Lumen, wo diese abgebaut werden. Durch Sequenzanalysen und Komplementationassays von Hefemutanten konnte bereits für einige Pflanzenproteine die funktionelle Konservierung gezeigt werden (Ketelaar *et al.*, 2004; Thompson *et al.*, 2005; Mitou *et al.*, 2009). Dies lässt vermuten, dass Hefen, Säuger und Pflanzen den gleichen Grundmechanismus der Autophagie teilen (Thompson *et al.*, 2005; Seay *et al.*, 2006). Die am besten untersuchten Autophagieproteine in Pflanzen sind die Proteine der zwei Ubiquitin-ähnlichen Konjugationssysteme, bestehend aus dem kovalent gebundenen Atg5 – Atg12 Konjugat, einem E1-Typ Enzym Atg7 und einem E2-ähnlichen Enzym Atg10 (Thompson *et al.*, 2005; Bassham, 2007). Im zweiten System wird Atg8 mit einem Lipid konjugiert, das E2-Enzym ist in diesem Fall Atg3. Beide Systeme sind für die Bildung von Autophagosomen notwendig (Yoshimoto *et al.*, 2004; Suzuki *et al.*, 2005). Das integrale Membranprotein Atg9 ist wahrscheinlich für die Lieferung von Membranen verantwortlich, die für die Bildung der Autophagosomen benötigt werden (Nair *et al.*, 2005; Bassham, 2007). Das multifunktionelle Atg6/Beclin1 Protein ist Teil des Phosphatidylinositol 3 – Kinase Komplexes und sowohl an der Initiierung der Autophagosomenbildung als auch an Proteintransporten beteiligt (Cao *et al.*, 2007).

Das Autophagie eine entscheidende Rolle bei pflanzlichen Abwehrreaktionen gegen Pathogene spielt ist unumstritten (Liu *et al.*, 2005; Seay *et al.*, 2006). Kontrovers diskutiert wird allerdings, welche genaue Funktion Autophagie bei diesen Abwehrreaktionen besitzt. Wie schon zuvor beschrieben zeigen Pflanzen als Antwort auf die Wirkung von Pathogen-erzeugten Effektorproteinen eine starke Abwehrreaktion, die als hypersensitive Reaktion (HR) bezeichnet wird. Hierbei werden Pflanzenzellen durch eine Art programmierten Zelltod abgetötet. In diesem Kontext gibt es Studien, die zeigen, dass Autophagie für die Limitierung des Zelltods, auf die entsprechenden befallenen Bereiche der Pflanze, zuständig ist (Seay *et al.*, 2006). Die Stilllegung („Silencing“) von Beclin1 in *Nicotiana benthamiana* Pflanzen, die das N Resistenzgen (NB-LRR Rezeptor) tragen, resultierte in reduzierter Autophagie und unkontrolliertem Zelltod (nicht nur auf die Infektionsstelle beschränkt) nach Infektion mit dem Tabak-Mosaikvirus (Liu *et al.*, 2005). In *A. thaliana* wurde gezeigt, dass Atg6 „Antisense“- Pflanzen, die mit einem inkompatiblen *P. syringae* Stamm infiziert wurden (wobei die Pflanze das entsprechende Resistenzgen trägt) eine sich

ausbreitende HR aufweisen, die in Wildtyp-Pflanzen nur im Bereich der Infektionsstelle zu beobachten ist (Patel *et al.*, 2008). Autophagie hätte in diesem Fall also eine zellschützende Funktion, wie es auch unter Nährstoff-limitierenden Bedingungen der Fall ist.

Alternativ könnte Autophagie selbst den Tod der Pflanzenzellen einleiten, beziehungsweise regulieren und somit selber eine zellschädigende Funktion ausüben (Baehrecke, 2005; Levine *et al.*, 2005). Programmierter Zelltod in Pflanzen zeigt viele morphologische Charakteristiken der Autophagie, wie zum Beispiel die Aufnahme von Organellen in die Vakuole, Vergrößerung der Vakuole und schließlich die Lyse der Vakuole mit folgendem Zelltod (Bassham, 2007; Gaffal *et al.*, 2007). Andererseits konnten Gemeinsamkeiten von programmiertem Zelltod in Pflanzen und apoptotischen Prozessen in Tieren beobachtet werden, wie zum Beispiel DNA Spaltung („DNA-Laddering“; Ryerson *et al.*, 1996) und die Aktivierung von Caspase-ähnlichen Proteasen (Navarre *et al.*, 1999). Pflanzen besitzen allerdings keine „echten“ Caspasen, die in Tierzellen ein wichtiger Bestandteil von apoptotischen Prozessen sind und auch das Vorhandensein der pflanzlichen Zellwand (Yu *et al.*, 2008; Talbot *et al.*, 2009) sowie das Fehlen eines aktiven Phagozytose-Systems sind einzigartige Merkmale von Pflanzen (Williams *et al.*, 2008). Die Unterscheidung von Apoptose und Autophagie in Pflanzen ist nicht eindeutig, da diese Prozesse sich stark überlappen (Shintani *et al.*, 2004). Dabei können Autophagie und Apoptose durch die gleichen Signale induziert werden, die wiederum über gemeinsame Signalwege kombinierte Zellantworten auslösen (Williams *et al.*, 2008). Hierbei kann Autophagie Zelltod auch indirekt durch die Induktion von Apoptose einleiten (Scott *et al.*, 2007). Abhängig von Zelltyp, Stimulus und Entwicklungsstadium der untersuchten Zellen wären sowohl Apoptose- als auch Autophagie-Prozesse für programmierten Zelltod denkbar.

Als zusätzliche Aufgabe der Autophagie wird die Eliminierung von intra- und extrazellulären Pathogenen postuliert. Diese Funktion konnte bereits für Viren wie das Herpes Simplex Virus gezeigt werden (Levine *et al.*, 2005; Talloczy *et al.*, 2006), sowie für einige Bakterien wie beispielsweise *Mycobacterium tuberculosis* (Gutierrez *et al.*, 2004; Colombo *et al.*, 2006). In beiden Fällen werden die Organismen von Autophagosomen eingeschlossen und zerstört. Autophagie als Prozess der pflanzlichen Immunabwehr beschreibt also hoch komplexe und stark regulierte Vorgänge mit höchst unterschiedlichen Funktionen.

1.2 *Ustilago maydis* – Der Erreger des Maisbeulenbrandes

Der Basidiomycet *U. maydis* ist ein hochspezialisierte, phytophagener Pilz, der zur Familie der Brandpilze gehört und in seiner Wirtspflanze Mais den sogenannten Maisbeulenbrand verursacht. Infizierte Pflanzen zeigen charakteristische Symptome auf allen oberirdischen Pflanzenteilen, wobei das Hauptmerkmal große tumorartige Wucherungen darstellen (Abb. 4; Christensen, 1963).



Abb. 4: **Symptome von *U. maydis*, dem Erreger des Maisbeulenbrandes.** Infizierte Maispflanzen zeigen charakteristische Symptome auf allen oberirdischen Pflanzenteilen, wobei die hier abgebildeten tumorösen Wucherungen das Hauptmerkmal der Krankheit darstellen. Photo: R. Rösser.

Innerhalb des hypertrophen Pflanzengewebes bilden sich große Mengen an schwarzen pilzlichen Teliosporen, die beim Aufplatzen der Tumore freigesetzt werden. Die auf diese Weise entlassenen Brandsporen verteilen sich über die Pflanze und verleihen ihr ein verbranntes Aussehen. Der wissenschaftliche Name des Pilzes bezieht sich auf diese Beobachtung und leitet sich von lateinisch *ustilare* (= verbrennen) ab. *U. maydis* hat sich zu einem Modellorganismus für viele Forschungsbereiche etabliert. Hierbei bieten besonders die Kultivierbarkeit unter axenischen Bedingungen sowie das vollständig entwickelte genetische System, mit hoch effizienter revers genetischer Zugänglichkeit und vielen zellbiologischen Ansätzen, eine gute Forschungsgrundlage (Brachmann *et al.*, 2004; Kämper, 2004; Steinberg *et al.*, 2008; Brefort *et al.*, 2009). In diesem Zusammenhang war auch die Veröffentlichung der vollständigen *U. maydis* Genomsequenz durch Kämper *et al.* (2006) ein wichtiger Schritt für die genauere Untersuchung des *U. maydis* – *Zea mays* Pathosystems.

1.2.1 Der Lebenszyklus von *U. maydis*

Wie bei allen Brandpilzen ist die pathogene Entwicklung von *U. maydis* mit der sexuellen Entwicklung gekoppelt; der Weg über die Wirtspflanze Mais ist dabei unumgänglich. In der saprophytischen Phase des Lebenszyklus vermehren sich die hefeartigen haploiden

Sporidien durch Knospung nur asexuell (Abb. 5 A). Erst durch die Fusion zweier kompatibler Sporidien mit unterschiedlichen Paarungsloci wird die Entwicklung des infektiösen Dikaryons eingeleitet (Gillissen *et al.*, 1992). Der biallelische *a* Locus codiert für ein Pheromon-Rezeptor-System, welches für die Zell/Zell-Erkennung in haploiden Sporidien mit unterschiedlichen *a* Loci und deren anschließende Fusion verantwortlich ist (Bölker *et al.*, 1992). Die Pheromone vermitteln hierbei die Ausbildung der Konjugationshyphen (Abb. 5 B; Bowman, 1946; Snetselaar *et al.*, 1992; Snetselaar *et al.*, 1993; Spellig *et al.*, 1994), die entlang eines Pheromongradienten aufeinander zu wachsen und anschließend zu einem dikaryotischen Filament fusionieren (Abb. 5 C; Rowell, 1955; Snetselaar *et al.*, 1993; Snetselaar *et al.*, 1996). Das filamentöse Wachstum dieses Dikaryons sowie die anschließende pathogene Entwicklung innerhalb der Pflanze benötigt einen weiteren Kreuzungstyplocus, den sogenannten *b* Locus. Dieser multiallelische Locus codiert für zwei Homeodomänen Transkriptionsfaktoren, *bE* und *bW*, die dimerisieren, wenn sie von zwei unterschiedlichen Allelen stammen. Der entstehende Heterodimer-Komplex aus *bE* und *bW* induziert schließlich Filamentbildung und sexuelle/pathogene Entwicklung durch Regulation von Pathogenitätsgenen (Kämper *et al.*, 1995; Brachmann *et al.*, 2001; Banuett, 2007). Auf der Pflanzenoberfläche wächst das dikaryotische Filament durch Spitzenwachstum, wobei das Cytoplasma in der Spitzenzelle akkumuliert, während ältere Bereiche der Hyphe durch Septierung von diesem Teil räumlich abgetrennt werden und leer erscheinen (Banuett *et al.*, 1994). Die Hydrophobizität der Pflanzenoberfläche sowie Cutin Monomere stimulieren die Differenzierung der Spitzenzelle in ein sogenanntes Appressorium (Snetselaar *et al.*, 1992; Mendoza-Mendoza *et al.*, 2009). Da es sich bei diesem Appressorium lediglich um eine terminale Verdickung der Spitzenzelle handelt, wird vermutet, dass die Penetration der Pflanzenzelle vor allem durch lytische Enzyme und weniger durch mechanischen Druck erreicht wird (Schirawski *et al.*, 2005; Doehlemann *et al.*, 2008b). Während *U. maydis* in die Pflanzenzelle eindringt wird die pflanzliche Plasmamembran invaginiert, wodurch eine biotrophe Interaktionszone entsteht. Der Pilz wächst zunächst intrazellulär ohne direkten Kontakt zum Cytoplasma der Pflanze (Abb. 5 D; Snetselaar *et al.*, 1993; Doehlemann *et al.*, 2009). Da *U. maydis* als biotrophes Pathogen auf das lebende Pflanzengewebe angewiesen ist, um seinen Lebenszyklus vollständig zu durchlaufen, ist es in diesem Stadium essenziell, den pflanzlichen Metabolismus zu reprogrammieren und die basalen Abwehrmechanismen, die durch die Erkennung des Pilzes von der Pflanze aktiviert werden, zu unterdrücken. Auf diese Weise entsteht eine biotrophe Interaktion zwischen Pilz und Pflanze (Doehlemann *et al.*, 2008a).

Sogenannte Effektorproteine, die in den apoplastischen Bereich zwischen Pilz und Pflanze sekretiert und teilweise auch von der Pflanzenzelle aufgenommen werden spielen eine essenzielle Rolle in der Etablierung der Biotrophie (Kämper *et al.*, 2006; Doehlemann *et al.*, 2009; Djamei *et al.*, 2011).

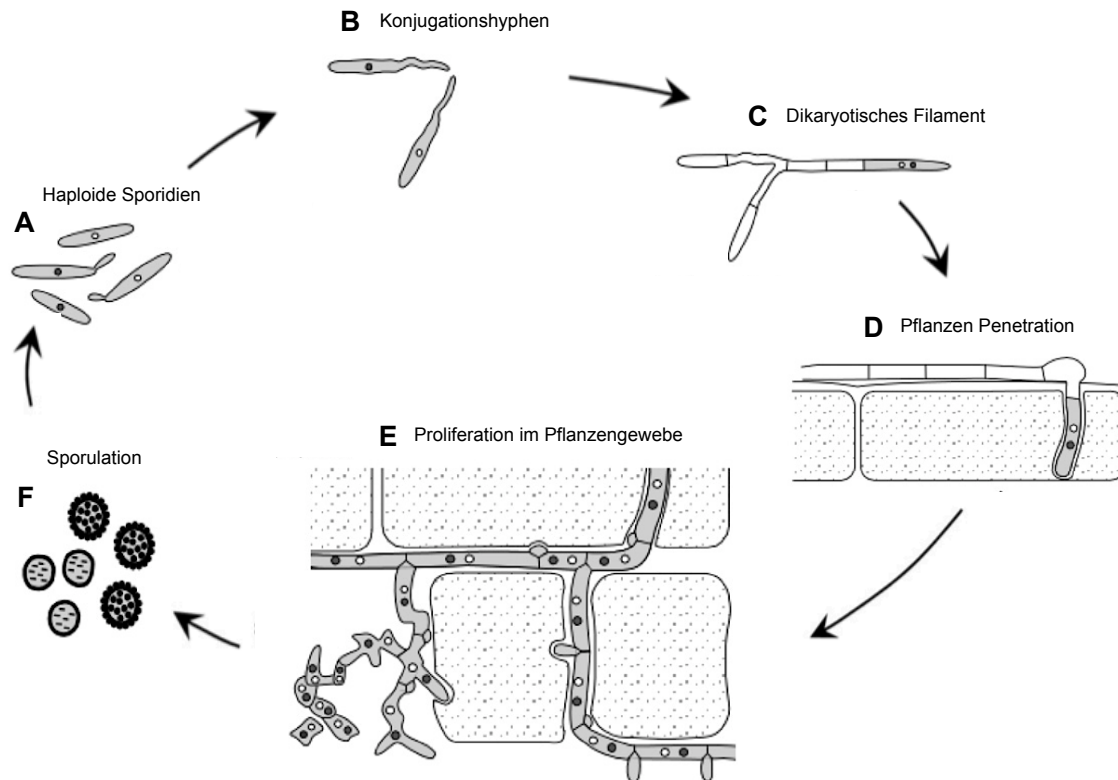


Abb. 5: **Schematische Darstellung des Lebenszyklus von *U. maydis*.** Der biphasische Lebenszyklus lässt sich in ein saprophytisches (A-C) und ein biotrophes Stadium (D-F) unterteilen. Nähere Informationen befinden sich im Text. Abbildung verändert nach Doehlemann *et al.* (2008b).

Nach erfolgreicher Unterdrückung der basalen Pflanzenabwehr proliferieren die Hyphen intra- und extrazellulär (Doehlemann *et al.*, 2008b). Fünf bis sechs Tage nach Infektion bilden sich große pilzliche Aggregate in apoplastischen Zwischenräumen des Tumorgewebes (Abb. 5 E; Banuett *et al.*, 1994; Doehlemann *et al.*, 2008b). In diesen Aggregaten findet schließlich auch die Karyogamie statt, wobei die diploiden Teliosporen gebildet werden (Abb. 5 F; Banuett *et al.*, 1996). Unter günstigen Bedingungen keimen die Sporen aus und bilden Probasidien, in denen die Meiose erfolgt und von denen sich haploide Zellen abschnüren (Christensen, 1963). Die Bildung der haploiden Sporidien schließt den Lebenszyklus.

1.2.2 Sekretierte Effektoren von *U. maydis*

Biotrophe Pilze, wie *U. maydis*, sind auf das lebende Pflanzengewebe ihrer Wirtspflanzen angewiesen, um ihren Lebenszyklus vollständig zu durchlaufen und mit Nährstoffen versorgt zu werden (Lewis, 1973). Zur Etablierung der Kompatibilität sind die Umprogrammierung des pflanzlichen Metabolismus zugunsten des Pathogens sowie die Unterdrückung der zuvor beschriebenen, PAMP-induzierten Abwehrreaktionen essenziell für das Überleben des Pathogens (Dangl, 1995; Doehlemann *et al.*, 2008b). Um diesen Abwehrreaktionen entgegen zu wirken, sekretieren phytopathogene Organismen Effektorproteine, die mit der Pflanzenabwehr interferieren und Suszeptibilität auslösen (Jones *et al.*, 2006). Im 20,5 MB *U. maydis* Genom konnten 6,902 Protein-codierende Gene vorhergesagt werden, wobei für 426 Proteine eine hohe Sekretionswahrscheinlichkeit gezeigt werden konnte, die durch bioinformatische Analysen mittels SignalP und ProtCom ermittelt wurde (Kämper *et al.*, 2006). Müller *et al.* (2008) sagten durch weniger strenge Analysebedingungen insgesamt 554 potenziell sekretierte Proteine voraus, von denen 168 Proteine für mögliche Enzyme codieren. Für den mit 386 Proteinen größeren Teil konnten wenige Funktionen vorausgesagt werden, wobei viele dieser Proteine spezifisch für *U. maydis* sind (Kämper *et al.*, 2006). Interessanterweise konnte für einen Großteil der Effektorproteine ohne annotierte Funktion eine Clusterung der zugehörigen Gene im *Ustilago*-Genom gezeigt werden. Die zwölf Cluster bestehen aus 3 – 26 Genen, deren Expression meist spezifisch während der biotrophen Wachstumsphase im Tumorgewebe induziert wurde (Kämper *et al.*, 2006). Deletionsmutanten dieser Gencluster zeigten nach der Infektion von Maissetzlingen ganz unterschiedlich ausgeprägte Symptome. Während für sieben Clustermutanten die Virulenz unverändert blieb konnten bei den restlichen fünf Clustermutanten starke Veränderungen der Virulenz, die von Hypervirulenz bis hin zur Apathogenität reichen, beobachtet werden. Da durch mikroskopische Analysen gezeigt werden konnte, dass die einzelnen Deletionsmutanten Defekte in unterschiedlichen Stadien der Infektion aufweisen müssen die Effektorproteine diskrete zelluläre Ziele haben (Brefort *et al.*, 2009). Für einige *U. maydis* Effektoren konnte bereits eine Funktion identifiziert werden. Beispielsweise unterdrückt das sekretierte Protein Pep1 aktiv die basale Pflanzenimmunität durch die Inhibition der Peroxidaseaktivität des Wirtes (Hemetsberger *et al.*, 2012). Des Weiteren konnte für einen sekretierten Effektor mit Chorismatmutase-Aktivität gezeigt werden, dass er in die Pflanzenzelle aufgenommen wird und dort aktiv

den metabolischen Zustand der Pflanze ändert, um sie auf die Infektionen mit *U. maydis* vorzubereiten (Djamei *et al.*, 2011). Aufgrund dieser Ergebnisse ist unumstritten, dass Effektorproteine essenzielle Modulatoren in der *Ustilago*-Mais Interaktion darstellen. Daher ist eines der Hauptanliegen der derzeitigen Forschung die genaue, funktionelle Charakterisierung der unterschiedlichen Effektorproteine von *U. maydis*.

Des Weiteren zeigten Transkriptomanalysen von *U. maydis* infizierten Maispflanzen, dass unterschiedliche Maisorgane (Keimlinge, adulte Blätter und männliche Blüten) diskrete Antworten auf *U. maydis* Infektionen auslösen (Skibbe *et al.*, 2010). Eine Organspezifische Rolle von *U. maydis* Sekretom-Proteinen konnte für 47 Gene aus fünf Genclustern gezeigt werden. Insgesamt deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass *U. maydis*-induzierte Tumore Organ-spezifische Gene von Wirt und Pathogen benötigen. (Skibbe *et al.*, 2010) Insbesondere Mutanten von Cluster 19A zeigten eine starke Organspezifität, da in Keimlingen keine Tumore induziert wurden, während in adulten Blättern und in männlichen Blüten Tumorbildung beobachtet werden konnte (Skibbe *et al.*, 2010). Das Gencluster 19A ist das größte Cluster in *U. maydis* und besteht aus 24 Genen, die in 5 Genfamilien mit jeweils 2 - 5 Genen und in 6 Einzelgene unterteilt werden können (Abb. 6).

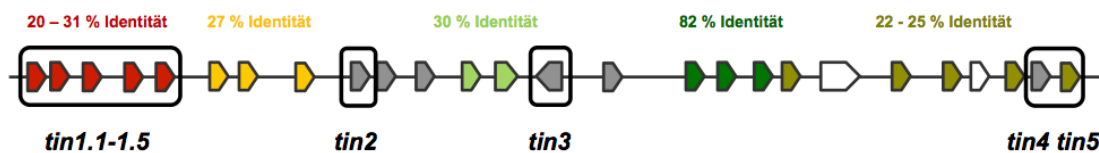


Abb. 6: **Organisation des Clusters 19A auf Chromosom 19 in *U. maydis*.** Das Cluster besteht aus 24 Genen, die für sekretierte Effektorproteine codieren. Farbige Pfeile symbolisieren die bioinformatisch vorhergesagte Sekretion. Die unterschiedlichen Farben stehen für Genfamilien, während nicht verwandte Clustergene in grau dargestellt sind. Schwarze Boxen zeigen die Haupteffektorgene von Cluster 19A. Abbildung verändert nach Kämper *et al.* (2006).

Transkriptionsanalysen zeigten, dass die Expression der sekretierten Effektoren spezifisch während der biotrophen Entwicklungsphase induziert wurde (Kämper *et al.*, 2006). Die Deletion des gesamten Clusters hat keinen Einfluß auf das Wachstum und resultierte in Mutanten, die zwar das Pflanzengewebe penetrieren und auch innerhalb des Gewebes wachsen konnten, jedoch nur noch Schwellungen der Ligula hervorrufen konnten (Kämper *et al.*, 2006 ; Thomas Brefort, pers. Mitteilung). Weitere Deletionsanalysen identifizierten für die Infektion von Maiskeimlingen die Haupteffektorgene in der ersten Hälfte von Cluster 19A sowie *tin4* und *tin5*. Die Effekte konnten hierbei auf die Aktivität einer Genfamilie, bestehend aus 5 Genen (*tin1.1 – tin1.5*), und auf die zwei Einzelgene *tin2* und

tin3 zurückgeführt werden (Thomas Brefort, pers. Mitteilung). Untersuchungen der *tin3* Deletionsmutante konnten bereits eine Bedeutung des Tin3 Proteins für die Virulenz von *U. maydis* zeigen, wobei vor allem die Tumorproduktion betroffen war (T. Brefort, pers. Mitteilung). Des Weiteren konnten durch eine erste Hefe Zwei-Hybrid-Analyse multiple Interaktionspartner von Tin3 identifiziert werden. Dabei wurde Tin3 ohne Signalpeptid mit der GAL4-Bindedomäne fusioniert und als Köderprotein verwendet. Als Bibliothek für die Suche nach Interaktionspartnern von Tin3 diente eine cDNA-Bank aus infiziertem Pflanzenmaterial (2 und 5 dpi Gemisch). Mit Hilfe dieser Analyse wurden vier interessante mögliche Interaktionspartner identifiziert (Tabelle 1).

Tabelle 1: Mögliche Interaktionspartner von Tin3, die in einer Hefe Zwei-Hybrid-Analyse mit einer cDNA-Bank aus infiziertem Pflanzenmaterial identifiziert wurden (Thomas Brefort, pers. Mitteilung).¹

Interaktionspartner	Protein Annotation
Suf4	<u>S</u> uppressor of <u>f</u> rigid 4, Transkriptionsfaktor mit C ₂ H ₂ -Zn-Finger, LRR-Domäne und Extensin-Domäne. Negativer Regulator der Blütenentwicklung, der in <i>A. thaliana</i> auch in Blattgefäßen exprimiert wird. (90x)
Beclin1	Beclin1 (=Atg6) ist ein Autophagie-Gen welches zusammen mit der Kinase Vps34 für die Initiierung der Autophagosomenbildung notwendig ist. In <i>N. benthamiana</i> verhindert Beclin1 systemischen Zelltod und ist außerdem an der Pollenkeimung in <i>A. thaliana</i> beteiligt. (>48x)
Arf1	<u>A</u> uxin <u>r</u> esponse <u>f</u> actor 7 ist ein Transkriptionsfaktor mit B3 DNA-Bindedomäne und C-terminaler Dimerisierungsdomäne. Gehört zur Familie von Transkriptionsfaktoren mit verschiedensten Aufgaben im Laufe der Pflanzenentwicklung. (>46x)
Mir3	<u>M</u> aize <u>i</u> nbred <u>r</u> esistant 3 ist eine sekretierte Cysteinprotease mit konservierter Propeptiddomäne, der Proteasedomäne mit dem typischen aktiven Zentrum und einer C-terminalen Granulindomäne. Die Protease ist an Abwehrreaktionen der Pflanze beteiligt. (1x)

¹In Klammern ist die Anzahl der jeweils isolierten Klone wiedergegeben

² In allen Fällen waren die Interaktionspartner keine Volllängen-Proteine

Unter diesen Proteinen befanden sich drei intrazelluläre pflanzliche Regulatorproteine: das *suf4* (suppressor of frigid 4) Gen codiert für einen Transkriptionsfaktor (Suf4) mit C₂H₂-Zn-Finger, BED-, LRR- und Extensin-Domäne und ist ein negativer Regulator der Blütenentwicklung in *A. thaliana* (de Haar *et al.*, 2004). Arf1 ist ein Auxin-Response Faktor, der zu einer Familie von Transkriptionsfaktoren gehört, die vielseitige Rollen während der Entwicklungsphase spielen (Kaschani *et al.*, 2010). Der dritte intrazelluläre Interaktionspartner Beclin1 (=Atg6) ist ein Autophagie-Protein, welches zusammen mit der Kinase Vps34 für die Initiierung der Autophagosomenbildung notwendig ist. In *N. benthamiana* verhindert Beclin1 systemischen Zelltod und ist außerdem an der Pollenkeimung in *A. thaliana* beteiligt (Thordal-Christensen *et al.*, 1997). Interessanter

Weise wurde auch die sekretierte pflanzliche Cysteinprotease Mir3 identifiziert, die eine Rolle bei der Pflanzenabwehr spielt. Eine Übersicht der Interaktionspartner findet sich in Tabelle 1. Diese Daten wurden als Grundlage für die vorliegende Arbeit verwendet und sollten durch weitere Analysen verifiziert und durch eine genaue phänotypische Charakterisierung der *tin3* Mutante bestätigt werden.

1.3 Fragestellung dieser Arbeit

In dieser Arbeit sollte das *U. maydis* Effektorprotein Tin3 funktionell charakterisiert werden, um seine genaue Rolle während der biotrophen Entwicklungsphase zu beschreiben. Da der Schwerpunkt dieser Arbeit auf der Untersuchung der Tin3 Proteinfunktion liegt, sollten die zuvor gefundenen Interaktionspartner Suf4, Beclin1, Arf1 und Mir3 als Vollängen-Proteine auf Interaktion getestet werden, um später durch eine Kombination aus biochemischen, mikroskopischen und zellbiologischen Methoden die Interaktionen zu charakterisieren sowie die biologische Relevanz dieser Funktionen für die pathogene Entwicklung zu zeigen.

2 Ergebnisse

2.1 Sequenzvergleich des Tin3 Effektorproteins

Das *tin3* Effektorgen (*um10556*) liegt auf Chromosom 19 und codiert für ein 30,4 kD Protein. Bioinformatische Analysen zeigten, dass im N-Terminus ein putatives Signalpeptid mit einer Länge von 21 Aminosäuren vorhanden ist. Mit Hilfe des Programms TargetP konnte das Vorhandensein des Signalpeptids mit 98 % vorhergesagt werden (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>); die Spaltstelle des Signalpeptids wurde durch SignalP 4.1 ermittelt, wobei die ersten 21 Aminosäuren mit einer Wahrscheinlichkeit von 84 % als funktionelles Signalpeptid bestätigt wurden (www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/). Da Signalpeptide das Transportziel eines Proteins nach der Translation bestimmen, ist zu vermuten, dass das Effektorprotein Tin3 über den klassischen Sekretionsweg durch Exocytose bis in den apoplastischen Bereich transportiert wird.

Tin3	1	mkcfsfillqalfwpslvfgvklplipssascvqaakdildatkpneli
Sr10060	1	mkglatlfvg-----sqvkaalrlideenygg-v
Sci00002_61_g	1	mkkpttvlhsflflvcavavtalpllpagvsqveaalaladkskfsqpl
Tin3	51	pphklaskfyrslflegdprpfaihhqvqsqafyrmyidhymhlrvkpl
Sr10060	29	tgetlakrlyplstlegdprphaihhqlqsqafyrmmidrylhfkylhp
Sci00002_61_g	51	satelgeklvslsvlegdpsrpfaikqqlqsqafyrmmadrvafrpda-
Tin3	101	ydelqrgrvnilvplghnqggstaenqatsltfdilsaynafddlvdef
Sr10060	78	ype--rg-----fqrqayetfdnlidgy
Sci00002_61_g	100	----kglpivf-----ahrrfdelvdry
Tin3	151	wknyasiyagkywgrlh-----nkre-----fl-----ienkd
Sr10060	100	wrhykgeyvqkykrreh-----atrqtckkydaekflqniypelpayd
Sci00002_61_g	119	weafsaeyvlykykervhrelldwykhdkqe-----ylk-----vqipe
Tin3	179	-----t-----fet
Sr10060	142	-----tsggrfks
Sci00002_61_g	156	ivksrmagwvqgaipssqvpgseksqealttffteqeliqsp-----fnt
Tin3	183	tyldlpedkkailgy-----qnknkvrdylyhlramh---
Sr10060	150	gyaelpndkkaatey-----lrtgtrakafdrhlinsv---
Sci00002_61_g	202	hyqdlpdekrtaikyldneygefsnvegsssrspwagklfhyvliniye
Tin3	216	giam-nhigaleakddiaqrassllastsqdhrtdgkeyvfidegtss
Sr10060	183	diavrnhiiplmfsgstdlrrfsnvea-tsrrptvd-----
Sci00002_61_g	252	taar-ehilskfssedpntlrr-----

Abb. 7: Aminosäuresequenzvergleich von Tin3 (*um10556*) aus *U. maydis* und den Orthologen *Sr10060* aus *S. reilianum* und *Sci00002_61_g* aus *S. scitamineum*. Identische Aminosäuren wurden grau hinterlegt (Aa-Vergleich „Global Protein Alignment“/BLOSUM62 Matrix, Clonemanager 9.0). Das Signalpeptid von *U. maydis* hat eine Länge von 21 Aminosäuren und wurde rot umrandet (SignalP; <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Insgesamt beträgt die Sequenzkonservierung 33 % bzw. 27 % (Identität x Überlapp/Länge). Im konservierten Bereich (As 55 - 99), der grün umrandet wurde, beträgt die Sequenzkonservierung 71 % bzw. 61 %.

Tin3 von *U. maydis* besitzt orthologe Proteine in den nahe verwandten Brandpilzen *S. reilianum* (Schirawski *et al.*, 2010) und *S. scitamineum* (G. Mannhaupt und R. Kahmann, pers. Mitteilung); in *U. hordei* (Laurie *et al.*, 2012) konnte kein Ortholog zu Tin3 identifiziert werden. Auf Aminosäureebene haben die Proteine eine Identität von 33 % bzw. 27 % (Abb. 7). Im N-Terminus befindet sich dabei ein konservierter Bereich, der eine Identität von 71 % bzw. 61 % zeigt, was eine besondere Funktion dieses Bereichs vermuten lässt. Durch weitere bioinformatische Analysen konnten weder zu Proteinen mit bekannter Funktion noch zu funktionellen Domänen Ähnlichkeiten festgestellt werden.

2.2 Expression von *tin3* wird spezifisch während der biotrophen Phase induziert

Expressionsmuster von Genen liefern wichtige Informationen über den Zeitpunkt beziehungsweise das Entwicklungsstadium des Pilzes, in dem das Gen eine wichtige Rolle spielen könnte. Die Expression von *tin3* im Verlauf der Entwicklung von *U. maydis* wurde durch quantitative „real time“ PCR (qPCR) bestimmt. Hierfür wurde RNA aus saprophytisch wachsenden Zellen des *U. maydis* Stamms SG200 in YEPS_{light}, sowie aus SG200-infiziertem Pflanzenmaterial im Verlauf der biotrophen Entwicklung (2, 3, 4, 8, 10 und 12 dpi („days post infection“)) extrahiert und in cDNA revers transkribiert. Als Referenzgen wurde das konstitutiv exprimierte Pilzgen *ppi* (Peptidylprolyl-Isomerase) verwendet (Bohlmann, 1996).

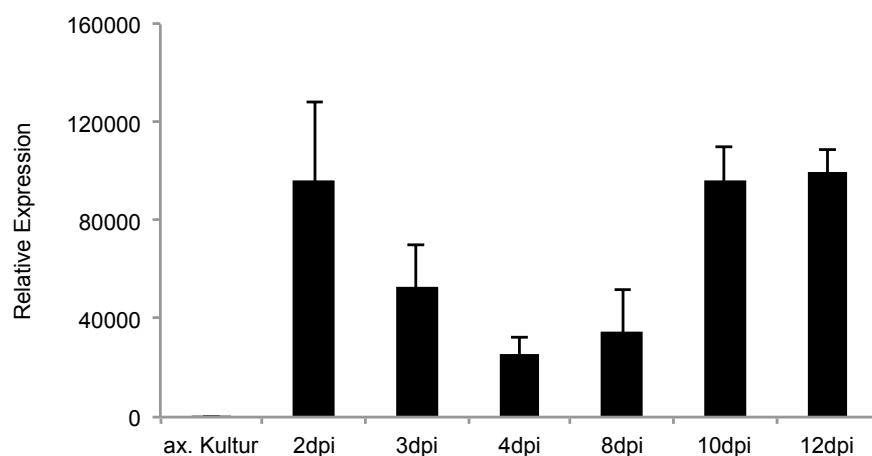


Abb. 8: **Quantitative „real-time“ PCR von *tin3*.** Die relative Expression von *tin3* im Verhältnis zum konstitutiv exprimierten Pilzgen *ppi* wurde bestimmt und gegen die Expression in axenischer Kultur normalisiert. RNA wurde von saprophytisch wachsenden Sporidien sowie von infizierten Maisblättern (2 - 12 dpi) extrahiert und in cDNA revers transkribiert. Die Expression von *tin3* wurde dabei spezifisch während der biotrophen Phase induziert und zeigte Höchstwerte in der frühen sowie der späten Entwicklungsphase. Die Mittelwerte aus drei biologischen Replikaten wurden \pm Standardabweichung dargestellt.

Bei Anzucht von *U. maydis* Stamm SG200 in YEPS_{light} wurde *tin3* nur sehr schwach exprimiert und ist deshalb für dieses Stadium nicht von Bedeutung. Im Gegensatz hierzu wurde das Effektorgen spezifisch und sehr stark während der biotrophen Phase *in planta* induziert (Abb. 8). Mit einer relativen Expression von fast 100000, zeigte *tin3* Expressionspeaks in den frühen (2 dpi) und späten (10 und 12 dpi) Zeitpunkten der Infektion.

2.3 *Tin3* wird von *U. maydis* in den Apoplasten von Maiszellen sekretiert

Bisherige *in planta* Lokalisationsstudien, mit Hilfe einer C-terminalen *tin3-GFP* Fusion unter nativem Promotor, zeigten eine Akkumulation des Fusionsproteins in den Spitzen der Hyphen und in Zell-Zell-Passagen, Bereiche an denen normalerweise Proteine sekretiert werden (Abb. 9 A, von Thomas Brefort zur Verfügung gestellt). Allerdings konnten die Mikroskopiebilder die Sekretion von Tin3 nicht eindeutig beweisen.

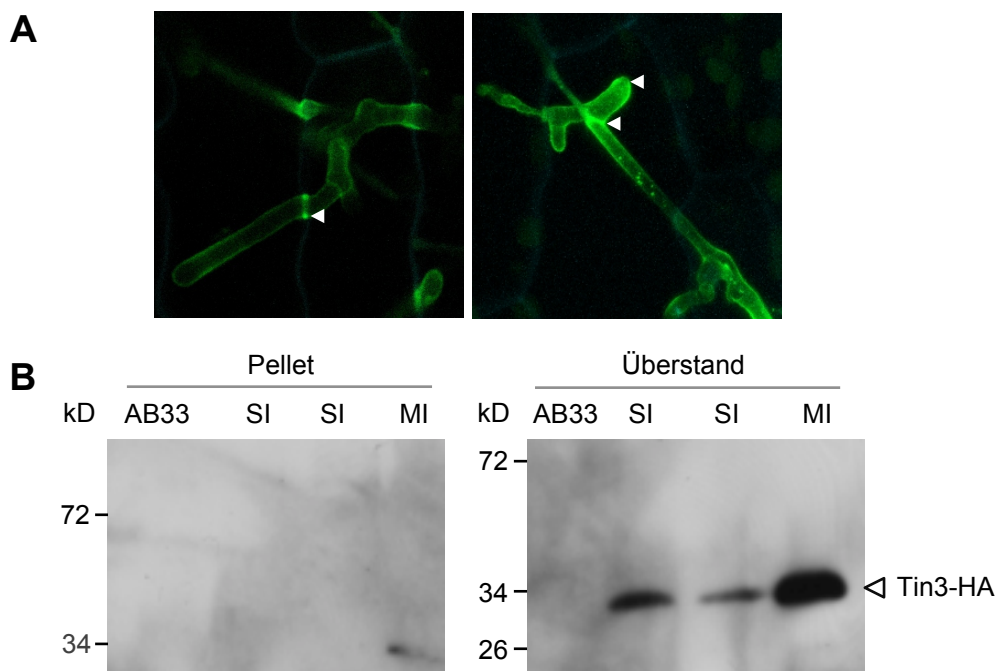


Abb. 9: **Tin3-GFP Lokalisation *in planta* und Western-Blot Analyse zur Untersuchung der Tin3 Sekretion in AB33*tin3*-HA.** **A** Lokalisation des Tin3-GFP Fusionsproteins nach Infektion von Maispflanzen mit SG200-*tin3*-eGFP (von Thomas Brefort zur Verfügung gestellt). Pfeile markieren Akkumulationsstellen von Tin3-GFP in Hyphenspitzen, Zell-Zell-Passagen und im apoplastischen Bereich, der die Zellen umgibt (Bild freundlicherweise von Thomas Brefort zur Verfügung gestellt). **B** Pellet- und Überstandsfraktionen von AB33 als Kontrollstamm und von AB33*tin3*-HA mit einfach (SI) und mehrfach (MI) Integration von *tin3*-HA in den *ip*-Locus wurden fraktioniert und für den Immunoblot mit anti-HA Antikörper verwendet. Das Tin3-HA Fusionsprotein konnte dabei als Vollängen-Protein in der Überstandsfraction detektiert werden.

Aus diesem Grund wurde von mir ein Experiment durchgeführt, bei dem eine *tin3*-HA Fusionsgen unter Kontrolle des konstitutiven *otef*-Promotors verwendet wurde, um das Fusionsprotein in Kulturüberständen von *b*-induzierten Filamenten nachzuweisen und somit die Sekretion zu bestätigen. Hierzu wurde der haploide *U. maydis* Stamm AB33 verwendet, in dem die Bildung *b*-abhängiger Filamente durch den Austausch von Ammonium- zu Nitratminimalmedium induziert werden kann, da in AB33 die *b*-Gene unter der Kontrolle eines Nitrat-induzierbaren *nar*-Promotors stehen (Brachmann *et al.*, 2001). Eine C-terminale *tin3*-HA Fusion wurde in einfacher oder multipler Kopie unter Kontrolle des *otef*-Promotors, in den *ip*-Locus von AB33 integriert (AB33*tin3*-HA). Nach Anzucht in Ammoniumminimalmedium erfolgte eine 5 stündige Induktion in Nitratminimalmedium. Die Pelletfraktion wurde aufgeschlossen und mit dem Überstand für Western-Blot Analysen verwendet. Das Volllängen-Protein Tin3-HA (31 kD) konnte sowohl in den Stämmen mit einfacher als auch in Stämmen mit mehrfacher Integration mittels anti-HA Antikörper im Kulturüberstand detektiert werden (Abb. 9 B). Im Kontrollstamm AB33 wurde kein Signal beobachtet, was die Spezifität des Tin3-HA Signals zeigt und somit die Sekretion von Tin3 und die Funktionalität des Signalpeptids bestätigt.

2.4 Phänotypische Charakterisierung der SG200Δ*tin3* Deletionsmutante

Der *tin3* Deletionsstamm SG200Δ*tin3* wurde durch homologe Rekombination generiert (von Thomas Brefort zur Verfügung gestellt). Um die Funktion von Tin3 im Laufe der Entwicklung von *U. maydis* zu untersuchen, wurde ein phänotypischer Vergleich des solopathogenen Referenzstamms SG200 und der Deletionsmutante SG200Δ*tin3* während der saprophytischen und der biotrophen Entwicklungsphase erstellt. Die Deletionsmutante wurde des Weiteren auch auf ihre Fähigkeiten hin untersucht, in Flüssigkultur zu wachsen und *b*-induzierte Filamente auf PD-Aktivkohleplatten zu bilden. Die Sensitivität von SG200Δ*tin3* in Bezug auf unterschiedliche Stressfaktoren wurde durch den Vergleich mit Referenzstamm SG200 und dem Komplementationsstamm SG200Δ*tin3*-*tin3* (von Thomas Brefort zur Verfügung gestellt) beurteilt. Außerdem wurde auch die Rolle von Tin3 für die pathogene Entwicklung in der Pflanze untersucht.

2.4.1 Tin3 spielt keine Rolle während der saprophytischen Phase von *U. maydis*

In Flüssigkultur konnten für Sporidien der Deletionsmutante SG200 Δ tin3 keine morphologischen Veränderungen im Vergleich zu SG200 festgestellt werden (Abb. 10 A). Die Induktion von *b*-induzierten Filamenten wurde auf PD-Aktivkohleplatten getestet, da dies ein essenzieller Schritt für die Differenzierung auf der Pflanzenoberfläche darstellt. Hierbei erscheint das dikaryotische Filament, aufgrund leerer Abschnitte in älteren Hyphenbereichen, als weißes Myzel (Day *et al.*, 1973). In Abb. 10 B wird deutlich, dass SG200 Δ tin3 keinen Unterschied zu SG200 zeigt und damit kein Filamentationsdefekt vorhanden ist.

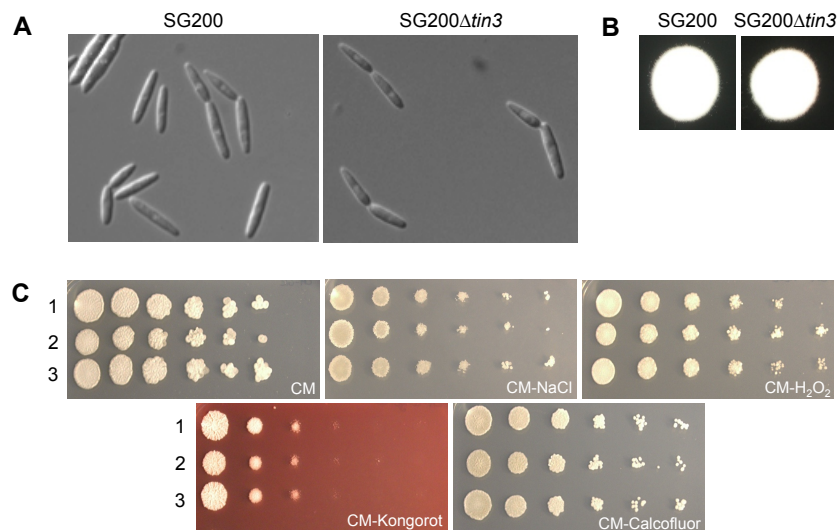


Abb. 10: **Phänotypische Charakterisierung der saprophytischen *U. maydis* Stadien von SG200 und SG200 Δ tin3.** **A** Sporidien der SG200 und SG200 Δ tin3 Flüssigkulturen. **B** Induktion von *b*-induzierten Filamenten in SG200 und SG200 Δ tin3 auf PD-Aktivkohleplatten. **C** Stress-Sensitivitätstest von SG200 (1), SG200 Δ tin3 (2) und SG200 Δ tin3-tin3 (3). Wachstum auf CM-Medium dient als Kontrolle, 1M NaCl zur Erzeugung von osmotischen Stress, 1,5 mM H₂O₂ für oxidativen Stress und 70 μ g/ml Kongorot oder 45 μ g/ml Calcofluor um Zellwandstress zu erzeugen. Keiner der Versuche konnte einen Unterschied zwischen SG200 und der Deletionsmutante aufzeigen.

Um die Rolle von Tin3 unter Stressbedingungen zu testen, wurden SG200, SG200 Δ tin3 und SG200 Δ tin3-tin3 auf unterschiedlichen Stressplatten untersucht. Hierbei diente das Wachstum auf CM-Medium als Kontrolle, die Zugabe von NaCl erzeugte osmotischen Stress, H₂O₂ oxidativen Stress und Kongorot und Calcofluor wurden eingesetzt, um Zellwandstress zu erzeugen. Auch unter Stressbedingungen konnte im Vergleich zum Kontrollstamm SG200 kein signifikanter Unterschied zur Mutante festgestellt werden. Tin3 hat somit keinen Einfluss bei der Reaktion auf umweltbedingte Stresssituationen (Abb. 10 C).

2.4.2 Die Rolle von Tin3 während der pathogenen Entwicklung von *U. maydis*

Expressionsanalysen von *tin3* konnten bereits zeigen, dass die Expression dieses Effektorgens spezifisch im Verlauf der biotrophen Phase induziert wurde. Aus diesem Grund war es von großer Bedeutung eine Rolle von Tin3 für die pathogene Entwicklung zu demonstrieren. In dieser Hinsicht konnten bereits vorherige Experimente darauf hin deuten, dass die Deletion von *tin3* zu einer signifikanten Reduktion der Tumorbildung bei infizierten Maispflanzen führt (Thomas Brefort, pers. Mitteilung). Im Folgenden wurden diese vorläufigen Ergebnisse durch Pathogenitätsanalysen verifiziert und durch Komplementationsanalysen abgesichert.

2.4.2.1 Die *tin3* Deletionsmutante zeigt eine reduzierte Virulenz

Die Virulenz verschiedener *U. maydis* Stämme wurde durch Pflanzeninfektionen untersucht. Hierfür wurden axenische Flüssigkulturen von SG200, SG200 Δ *tin3* und SG200 Δ *tin3-tin3* in sieben Tage alte Maispflanzen injiziert. Zwölf Tage nach Infektion wurden spezifisch induzierte Symptome der Maispflanzen untersucht und quantifiziert.

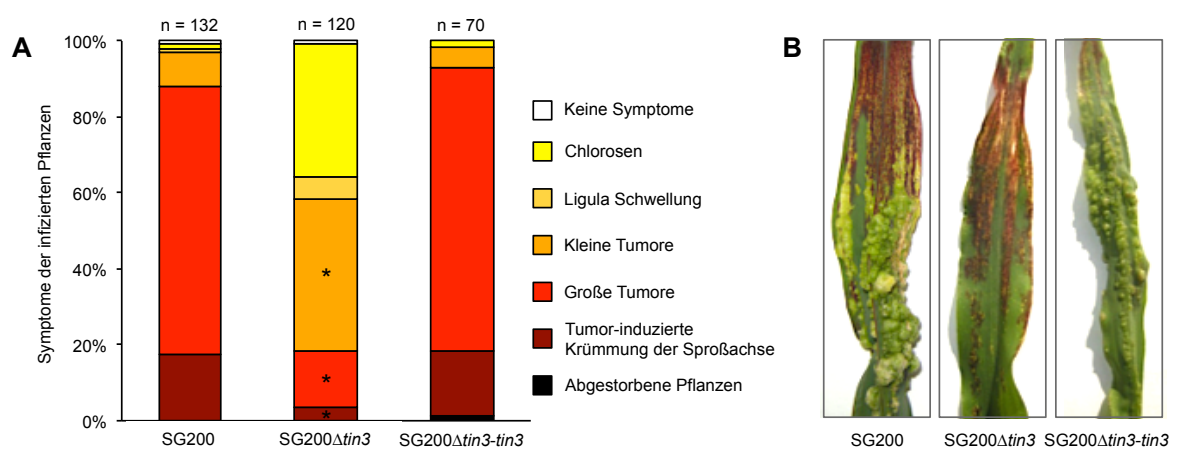


Abb. 11: **Virulenz von SG200, SG200 Δ *tin3* und Komplementationsstamm SG200 Δ *tin3-tin3*.** **A** Quantifizierung der Pflanzensymptome zwölf Tage nach Infektion mit SG200, SG200 Δ *tin3* und SG200 Δ *tin3-tin3*. Dabei wurden die Symptome in sieben Kategorien eingeteilt (Kämper *et al.*, 2006), die in der Legende angegeben wurden. Drei biologische Replikate wurden kombiniert, gemittelt und als prozentualer Anteil der Gesamtanzahl an Pflanzen (n) dargestellt. * < 0,05 signifikante Unterschiede zwischen SG200 und SG200 Δ *tin3*. **B** Die angegebenen Stämme wurden in sieben Tage alte Maispflanzen injiziert. Repräsentative Blätter zwölf Tage nach Infektion sind gezeigt.

Im Vergleich zu SG200 konnte für die Deletionsmutante eine stark reduzierte Virulenz festgestellt werden, wobei insbesondere große Tumore und Tumor-induzierte Krümmungen der Sproßachse signifikant reduziert waren (Abb. 11 A). Im Gegensatz dazu induzierte die Mutante signifikant mehr kleine Tumore. Für die Komplementation dieses

Phänotyps wurde der Stamm SG200 $\Delta tin3$ -*tin3* verwendet, in dem *tin3* als Einzelkopie unter Kontrolle des nativen Promotors, in den *ip*-Locus integriert ist (Dieser Stamm wurde freundlicherweise von Thomas Brefort zur Verfügung gestellt). Die Pathogenitätsanalyse dieses Stamms zeigte eine mit SG200 vergleichbare Virulenz, was bedeutet, dass der Virulenzdefekt der Mutante durch die Integration von *tin3* ausgeglichen werden konnte. Repräsentative Blätter von mit den jeweiligen Stämmen infizierten Pflanzen sind in Abb. 11 B dargestellt. SG200 und der Komplementationsstamm zeigen Tumore auf der gesamten Blattoberfläche, wohingegen im Falle der Mutante kaum Tumore sichtbar sind.

2.4.2.2 Die *tin3* Deletionsmutante zeigt einen Proliferationsdefekt in Pflanzengewebe

Neben den makroskopischen Veränderungen der Symptome nach Infektion mit der Deletionsmutante war es interessant die Proliferation von SG200 und SG200 $\Delta tin3$ im Pflanzengewebe zu vergleichen. Für mikroskopische Analysen wurde jeweils am zweiten und zwölften Tag nach Infektion der Bereich des dritten Blatts, der sich 2 cm unterhalb der Infektionsstelle befindet, geerntet und mit 0,1 % Tween20 gewaschen, um Pilzhyphen von der Pflanzenoberfläche zu entfernen. Pilzhyphen innerhalb des Blattmaterials wurden durch eine WGA-Alexafluor-488/Propidium-Iodid-Färbung (WGA-AF488/PPI) sichtbar gemacht. Dabei färbte Propidium-Iodid die Zellwände von lebenden Pflanzenzellen rot, während die Pilzhyphen durch WGA gefärbt werden. WGA ist ein Lektin, welches an das Chitin der Pilz-Zellwand bindet und an den grün-fluoreszierenden Farbstoff Alexafluor-488 gekoppelt ist. Die gefärbten Blätter wurden anschließend mittels konfokaler Laserscanning Mikroskopie untersucht. Beide Stämme zeigten eine effiziente Penetration der Pflanzenzellen und konnten sich innerhalb des Pflanzenmaterials weiter ausbreiten (Abb. 12 A). Es konnten anhand der Mikroskopiebilder allerdings keine Unterschiede zwischen SG200 und SG200 $\Delta tin3$ festgestellt werden. Zur Unterstützung der mikroskopischen Daten wurde die relative Pilzbiomasse von SG200 und der Deletionsmutante am zweiten und zwölften Tag nach Infektion verglichen. Das Pflanzenmaterial wurde, wie schon für die Mikroskopie beschrieben, geerntet und für die Extraktion von Gesamt-DNA verwendet. Anschließend wurde mittels quantitativer „real time“ PCR das pilzliche *ppi*- und das pflanzliche *GAPDH*-Gen amplifiziert. Beides sind konstitutiv exprimierte Gene, die als Kontrollgene für die Bestimmung der relativen Pilzmasse im Pflanzenmaterial dienen. Zwei Tage nach der Infektion zeigten die Stämme keine signifikanten Unterschiede, während zwölf Tage nach Infektion eine um 70 % reduzierte Biomasse in der *tin3* Mutante festgestellt werden konnte (Abb. 12 B). Dies

bedeutet, dass *SG200 Δ tin3* im Vergleich zu *SG200* einen Proliferationsdefekt in Pflanzengewebe besitzt.

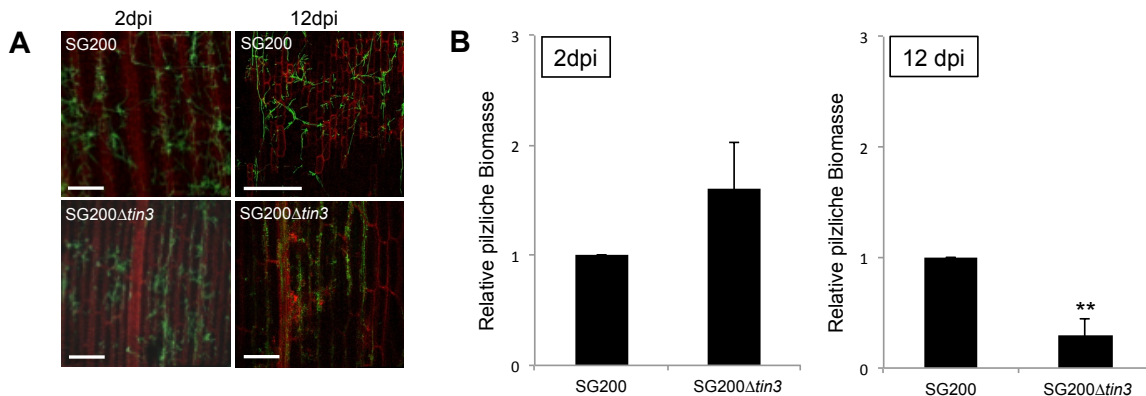


Abb. 12: **Kolonisation des Pflanzengewebes durch *SG200* und *SG200 Δ tin3*.** **A** Maispflanzen wurden mit *SG200* und *SG200 Δ tin3* infiziert und nach 2 bzw. 12 dpi geerntet. Pilzhyphen wurden mit WGA-AF488 gefärbt (grün), Pflanzenzellwände sowie tote Zellen mit Propidiumiodid (rot). Die gefärbten Blätter wurden anschließend mittels konfokaler Mikroskopie untersucht. Bei allen Bildern handelt es sich um Überlagerungen von mehreren Bildebenen, um einen räumlichen Überblick zu erhalten („Z-Stacks“). Der Längenmaßstab entspricht 25 μ m. **B** Für die Quantifizierung der relativen Pilzbioasse durch qPCR wurden jeweils 10 mit *SG200* und *SG200 Δ tin3* infizierte Maisblätter, nach zwei bzw. zwölf Tagen, geerntet. Gesamt-DNA wurde aus dem infizierten Blattmaterial extrahiert und für die Amplifikation von *ppi* (Pilzgen) und *GAPDH* (Pflanzengen) verwendet. Die Graphen zeigen das Verhältnis von Pilz-DNA zu Pflanzen-DNA, wobei *SG200* als Referenz verwendet und deshalb gleich 1 gesetzt wurde. Die Mittelwerte aus drei biologischen Replikaten wurden \pm Standardabweichung dargestellt. ** < 0,005 signifikante Unterschiede zwischen *SG200* und *SG200 Δ tin3*.

2.5 Tin3 interagiert mit zwei Maisproteinen

Um einzugrenzen, welche der vier möglichen Interaktionspartner von Tin3 aus der Zwei-Hybrid-Analyse (Tabelle 1) reale Interaktionspartner sein könnten, wurden alle vier Vollängen-Gene isoliert und auf Interaktion mit Tin3 getestet. pGBKT7-*tin3* Δ_{1-21} mit der GAL4 Bindedomäne (BD) wurde dabei als Köderplasmid verwendet, und die zu testenden Interaktionspartner wurden in pGADT7 mit der GAL4 Aktivierungsdomäne (AD) fusioniert und dienten als Beuteplasmide. Als Negativkontrolle wurden die beiden Leervektoren, pGADT7 und pGBKT7, in den Hefestamm AH109 transformiert. Die Autoaktivierung der einzelnen Gene wurde durch die Co-Transformation mit dem jeweils anderen Leervektor ausgeschlossen. Das Wachstum auf SD -Leu -Trp diente als Kontrolle, während die Stärke der Interaktion auf Hochstringenzmedien (SD -Leu -Trp -Ade -His). Um sicher zu stellen, dass die Fusionsproteine der *S. cerevisiae* Stämme, die in der Zwei-Hybrid-Analyse verwendet wurden, korrekt synthetisiert wurden, wurden Übernachtskulturen aller Stämme geerntet und nach Proteinaufschluss für Western-Blot

Analysen verwendet. Für Beclin1, Mir3 und Suf4 konnten Fusionsproteine detektiert werden (Abb. 13 B).

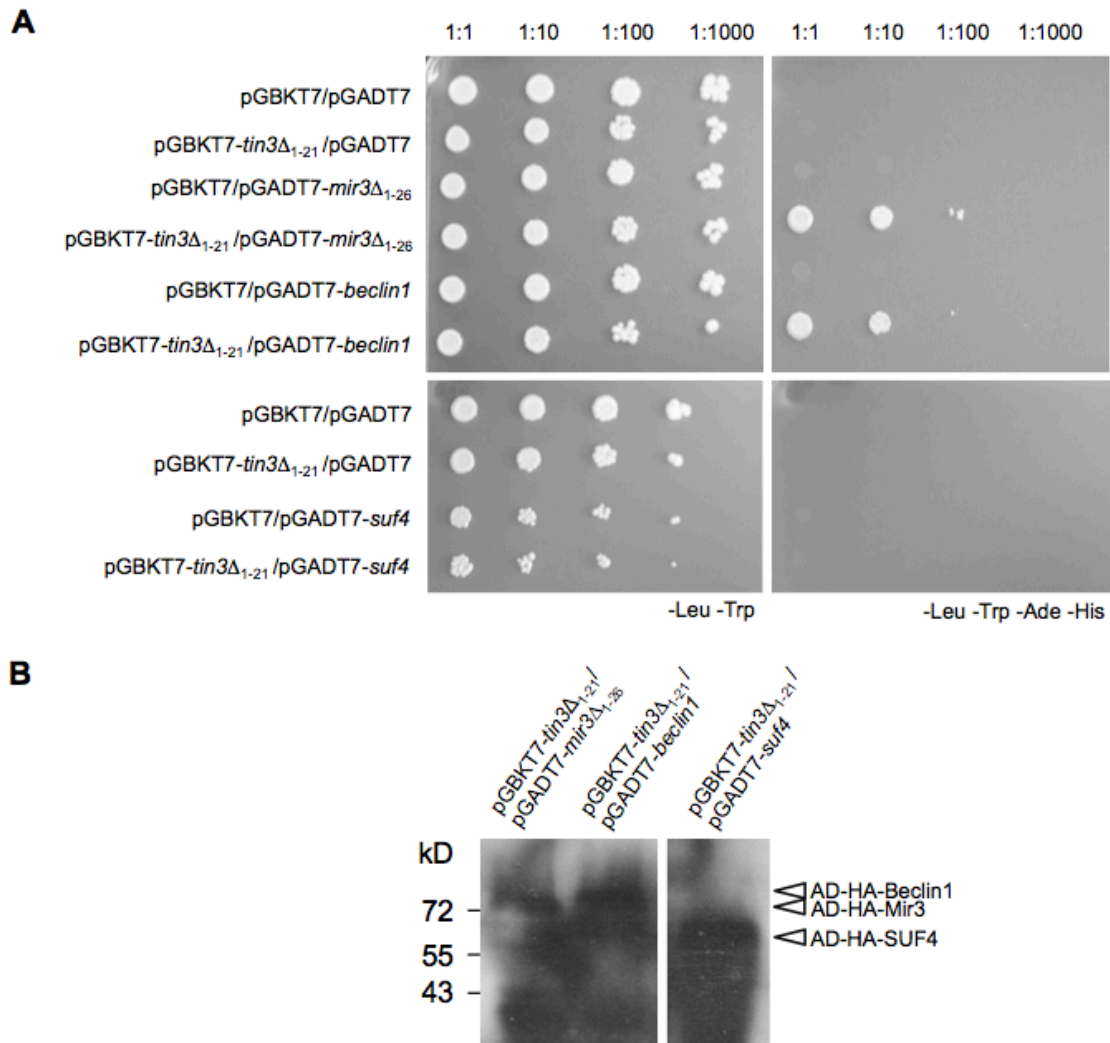


Abb. 13: **Hefe Zwei-Hybrid-Analyse mit potenziellen Vollängen-Interaktionspartnern des Tin3 Proteins.** **A** Die angegebenen pGBKT7 und pGADT7 Derivate wurden in den *S. cerevisiae* Stamm AH109 co-transformiert. Flüssigkulturen der entsprechenden Transformanten wurden anschließend in vier Verdünnungsstufen auf Kontrollplatten (SD -Leu -Trp) und Hochstringenzplatten (SD -Leu -Trp -Ade -His) getropft und für 4 Tage bei 28°C inkubiert. Hierbei konnte die Interaktion von Tin3 mit der Cysteinprotease Mir3 sowie dem Autophagie-Protein Beclin1 bestätigt werden. **B** Western-Blot Analyse der *S. cerevisiae* Stämme. Die Fusionsproteine AD-HA-Mir3 (72 kD), AD-HA-Beclin1 (82 kD) und AD-HA-Suf4 (61 kD) wurden mit anti-HA Antikörper nachgewiesen. Pfeilspitzen geben die detektierten Fusionsproteine an.

Die Interaktion von Tin3 mit der sekretierten Cysteinprotease Mir3 (ohne Signalpeptid) und dem Autophagie-Protein Beclin1 konnte bestätigt werden (Abb. 13). In beiden Fällen war auf den Hochstringenzplatten deutliches Wachstum zu erkennen. Der Pflanzenregulator Suf4 konnte als Interaktionspartner ausgeschlossen werden, da als Vollängen-Protein keine Interaktion mit Tin3 beobachtet werden konnte (Abb. 13). Für den Vollängen-Transkriptionsfaktor Arf1 war es nicht möglich, Hefetransformanten zu

generieren. Dadurch bleibt offen, ob dieses Protein mit Tin3 interagiert. Die Autoaktivierungskontrolle war für alle Proteine negative (Abb. 13). Dies bedeutet, dass Tin3 mit der sekretierten Mais-Cysteinprotease Mir3 und dem intrazellulären Autophagie Protein Beclin1 aus Mais interagiert.

2.6 Heterologe Expression und Aufreinigung von Tin3

Für funktionelle Analysen des Tin3 Effektorproteins wurde das Protein in einem heterologen System produziert und gereinigt. Dabei wurde Tin3 ohne N-terminales Signalpeptid, aber mit C-terminalem *Strep*-Tag (Tin3 Δ_{1-21} -*Strep*) rekombinant in *E. coli* hergestellt. Der *Strep*-Tag ist ein kurzes Peptid bestehend aus 8 Aminosäuren (WSHPQFEK), welches mit hoher Selektivität an Strep-Tactin, ein synthetisch hergestelltes Streptavidin, bindet. Als Expressionsvektor wurde pPR-iBA-101 verwendet. In diesem Plasmid steht *tin3* unter Kontrolle des T7-Promotors und die Expression kann durch Zugabe von IPTG induziert werden. *E. coli* BL21 Rosetta wurde als Expressionsstamm verwendet, da dieser tRNAs für fünf seltene Codons besitzt und dies die Translationseffizienz sowie die Löslichkeit des rekombinanten Proteins verbessern konnte. Das lösliche Tin3 Δ_{1-21} -*Strep* Protein, mit einem vorhergesagten Molekulargewicht von 34 kD, wurde anschließend über eine *Strep*-Tag Affinitätschromatographie gereinigt. Nach Optimierung der IPTG-Konzentration sowie der Induktionstemperatur und -zeit, konnte in den induzierten Fraktionen des *E. coli* Stamms BL21 Rosetta/pPR-iBA-101-*tin3* Δ_{1-21} -*Strep* eine Überproduktion des Tin3 Proteins demonstriert werden (Abb. 14 A). Nach Aufreinigung mittels *Strep*-Tag Affinitätschromatographie konnte in den Elutionsfraktionen eine deutliche Anreicherung erzielt werden (Abb. 14 A). Um die Menge an löslichem Tin3 Protein weiter zu erhöhen, wurden weitere *E. coli* Expressionsvektoren bzw. *E. coli* Expressionsstämme getestet, die allerdings nicht zur Optimierung der Tin3 Expression bzw. Löslichkeit beitragen konnten (Daten nicht gezeigt). Auch hat Expression in anderen Expressionssystemen, wie zum Beispiel in *Pichia pastoris*, nicht zu einer Verbesserung der Ausbeute an löslichem Protein geführt (nicht gezeigt). Für funktionelle Analysen und Kristallisierungsansätze wurde sehr sauberes Tin3 Protein in großen Mengen und hohen Konzentrationen benötigt. Aus diesem Grund wurden die Elutionsfraktionen der *Strep*-Affinitätschromatographie aus mehreren Aufreinigungen vereint, ankonzentriert und für die weitere Aufreinigung mittels Ionenaustauschchromatographie verwendet, um noch vorhandene Verunreinigungen zu entfernen. Hierbei konnte das Tin3 Δ_{1-21} -*Strep*

Fusionsprotein in der Durchflussfraktion und in der ersten Waschfraktion in hohen Konzentrationen und ohne Verunreinigungen detektiert werden (Abb. 14 B).

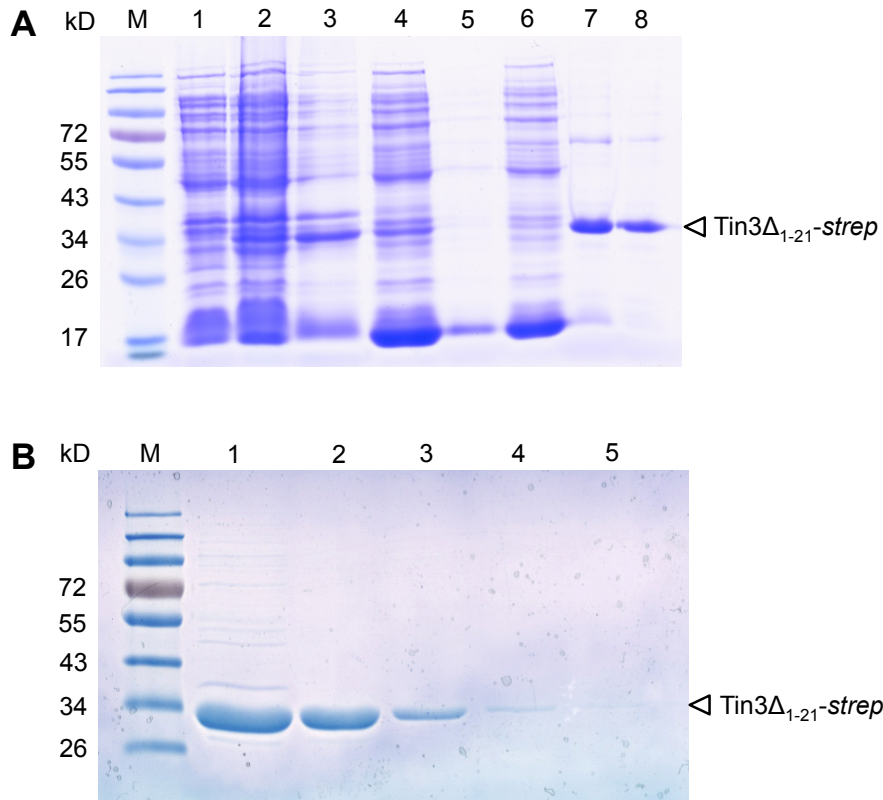


Abb. 14: **Heterologe Expression und Reinigung von Tin3Δ₁₋₂₁-Strep in *E. coli*.** Die Laufhöhe des 34kD Tin3Δ₁₋₂₁-Strep Fusionsproteins wurde mit Pfeilen markiert und der Größenstandard ist jeweils links angegeben. **A** Nach Überexpression von Tin3Δ₁₋₂₁-Strep konnte das Protein in der löslichen Fraktion detektiert und durch Strep-Affinitätschromatographie angereichert werden. **1:** uninduziert **2:** induziert **3:** Überstand **4:** Pellet **5:** Durchfluss **6:** Waschfraktion **7:** Elution **1** **8:** Elution **2**. **B** Ankonzentration und Ionenaustauschchromatographie der aufgereinigten Elutionsfraktionen. Das Tin3Δ₁₋₂₁-Strep Protein konnte im Durchfluss und in der ersten Waschfraktion als Einzelbande detektiert werden. **1:** ankonzentriert **2:** Durchfluss **3:** Waschfraktion **1** **4:** Waschfraktion **2** **5:** Waschfraktion **3**.

Das aufgereinigte Tin3Δ₁₋₂₁-Strep wurde anschließend zur Kristallisierung verwendet. Allerdings wurde in mehreren Ansätzen keine Bedingung gefunden, unter der das Tin3 Protein Kristalle bildet. NMR-Analysen zeigten, dass das gereinigte Tin3 in strukturierter Form vorliegt und einen Pi-Wert von 7,1 besitzt (Andrei Lupas, pers. Mitteilung).

2.7 Heterologe Expression und Aufreinigung von Mir3 und CP1A

Im nächsten Schritt wurde die Cysteinprotease Mir3, die in Hefe Zwei-Hybrid-Analysen als Interaktionspartner von Tin3 bestätigt wurde, heterolog exprimiert und aufgereinigt. Da die Mais-Cysteinprotease CP1A, die eine Aminosäureidentität von 92 % aufweist, durch massenspektrometrische Analysen bereits in Apoplastenflüssigkeit (AF) von Maisblättern

nachgewiesen werden konnte (van der Linde *et al.*, 2012) lag die Vermutung nahe, dass auch CP1A ein Interaktionspartner von Tin3 sein könnte. Beide Proteasen besitzen ein N-terminales Signalpeptid, eine Propeptid-Inhibitor-domäne, eine aktive Cysteinprotease-Domäne sowie zwei C-terminale Domänen, bestehend aus einem Prolin-reichen Bereich und einer Granulin-Domäne (in Abb. 15 A für Mir3 gezeigt).

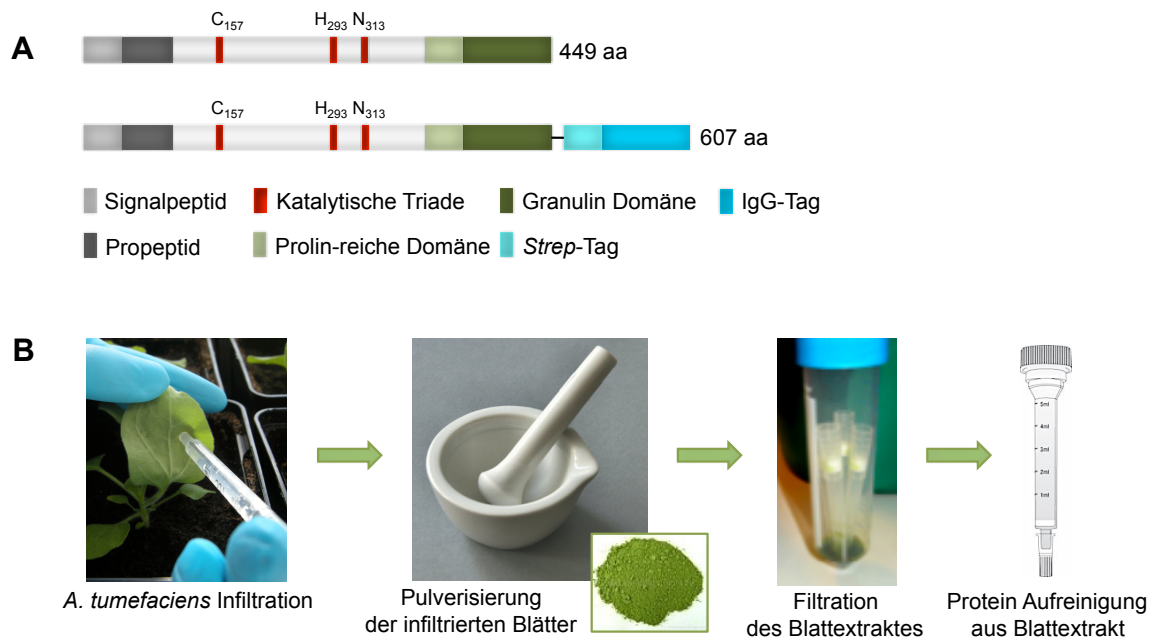


Abb. 15: **Mir3 Domänenarchitektur und schematische Darstellung der Mir3 Extraktion und Aufreinigung aus *N. benthamiana*.** **A** Domänenstruktur von Mir3 (oben) und Mir3-Strep-IgG (unten). Längen sind in Aminosäuren angegeben. Die einzelnen Domänen sind farbig markiert. **B** Schematische Darstellung der heterologen Expression von Mir3 und CP1A in *N. benthamiana* sowie der folgenden Schritte zur Aufreinigung der Fusionsproteine.

Da alle Versuche der heterologen Expression der Proteasen in *E. coli* und *P. pastoris* nicht erfolgreich waren (Daten nicht gezeigt) wurden Mir3 und CP1A in *N. benthamiana* exprimiert. Für die Aufreinigung wurden die Proteasen mit einem C-terminalen Strep-Tag sowie einem IgG-Proteintag fusioniert (Mir3-Strep-IgG bzw. CP1A-Strep-IgG) und in einen pBIN19AN Vektor kloniert, in dem die Gene unter der Kontrolle des 35S Promotors stehen. Nach Transformation in den *A. tumefaciens* Stamm GV3101 erfolgte eine durch *A. tumefaciens*-vermittelte, transiente Transformation in *N. benthamiana* (Abb. 15 B). Proteinextrakte aus *A. tumefaciens*-infiltrierten Tabakblättern wurden nach 4 Tagen zur Aufreinigung mittels IgG-Immunopräzipitation. Nach Abspaltung des IgG-Tags mittels Prescission Protease folgte eine Strep-Affinitätschromatographie (Abb. 15 B). Die Elutionsfraktion der Strep-Aufreinigung zeigte im SDS-Gel eine Anreicherung des 50kD Mir3-Strep Fusionsprotein (Abb. 16 A). Nach Silberfärbung konnten einige Verunreinigungen detektiert werden (Abb. 16 B).

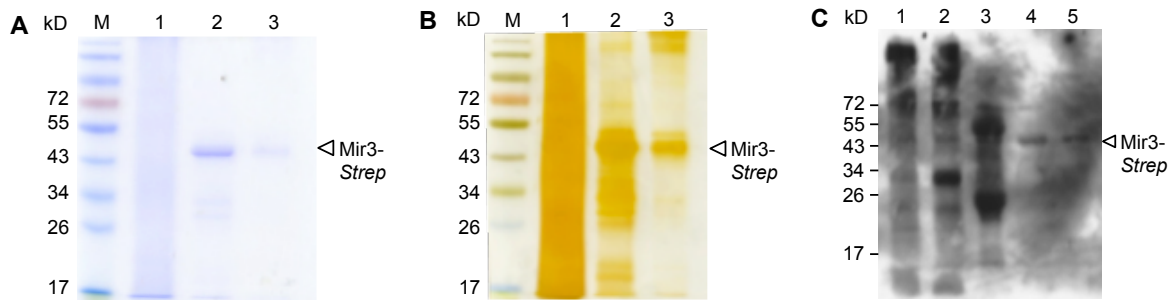


Abb. 16: **Heterologe Expression und Reinigung von Mir3 aus *N. benthamiana*.** Nach Überexpression von Mir3-Strep-IgG konnte das Fusionsprotein im Durchfluss der IgG-Matrix nach Abspaltung des IgG-Tags mittels Prescission Protease sowie in der Elutionsfraktion der Strep-Affinitätschromatographie detektiert werden. Pfeilspitzen geben die detektierten Fusionsproteine an und der Größenstandard ist jeweils links angegeben. **A** Coomassie-Färbung des SDS-Gels **1:** Pflanzenlysat der mit pBIN19AN-mir3-Strep-IgG infiltrierten Tabakblätter **2:** Abspaltung des IgG-Tags mittels Prescission Protease nach IgG-Pulldown **3:** Elutionsfraktion der Strep-Affinitätschromatographie (ankonzentriert). **B** Silberfärbung des SDS-Gels **1:** Pflanzenlysat der mit pBIN19AN-mir3-Strep-IgG infiltrierten Tabakblätter **2:** Abspaltung des IgG-Tags mittels Prescission Protease nach IgG-Pulldown **3:** Elutionsfraktion der Strep-Affinitätschromatographie (ankonzentriert) **C** Western-Blot Analyse mit Strep-Taktin-HRP Antikörpern. **1:** Pflanzenlysat der mit pBIN19AN-mir3-Strep-IgG infiltrierten Tabakblätter **2:** Durchfluss **3:** Proteine auf IgG-Matrix nach Prescission Protease Behandlung **4:** Abspaltung des IgG-Tags mittels Prescission Protease nach IgG-Pulldown **5:** Elutionsfraktion der Strep-Affinitätschromatographie (ankonzentriert).

Zur Absicherung der im SDS-Gel beobachteten Mir3-Strep Bande wurde eine Western-Blot Analyse verwendet, wobei Mir3-Strep spezifisch mit Strep-Taktin HRP Antikörpern detektiert wurde. Hierbei zeigten die Fraktionen vor der Strep-Aufreinigung mehrere unspezifische Banden, während in der Elutionsfraktion nur noch eine spezifische Bande für das Mir3-Strep Fusionsprotein zu sehen war sowie eine sehr schwache höhere Bande, die wahrscheinlich das nicht vollständig gespaltene Ausgangsprotein Mir3-Strep-IgG repräsentiert (Abb. 16 C). Die Fusionsproteine lagen in diesem Stadium noch als unaktivierte Proteasen vor und wurden vor der Verwendung in Protease-Aktivitätstests durch Zugabe von DTT und einer pH-Wert Senkung auf pH 5,0 aktiviert, wobei das Propeptid abgespalten wurde.

2.8 Das Effektorprotein Tin3 als Proteaseinhibitor

Da die Mais Cysteinprotease Mir3 in Hefe Zwei-Hybrid-Analysen als Interaktionspartner von Tin3 identifiziert wurde, konnte eine mögliche Funktion von Tin3 als Proteaseinhibitor vermutet werden. Um diese mögliche Proteaseinhibitor-Funktion von Tin3 zu überprüfen, wurden die aufgereinigten und aktivierten Proteasen für *in vitro* Protease-Aktivitätstests verwendet. Eine mögliche Spaltung von Tin3 durch die Protease wurde ebenfalls

untersucht. Des Weiteren wurde *in vivo* die Spezifität der Tin3 Inhibition getestet, wobei Blattlysate, von SG200 und SG200 $\Delta tin3$ infizierten Maisblättern sowie apoplastische Flüssigkeit von Salicylsäure-infiltrierten Maisblättern, verwendet wurden.

2.8.1 Tin3 inhibiert die Cysteinprotease Mir3

Die Aktivität der aufgereinigten, aktivierten Protease wurde durch Inkubation mit einem spezifischen Fluoreszenz-Substrat (Z-Phe-Arg-AMC) bestimmt. Spezifität der gemessenen Aktivität wurde durch Zugabe des Cysteinprotease-Inhibitors E-64 bestätigt, welcher die Aktivität von Mir3 komplett hemmen konnte (Abb. 17). Die Zugabe des aufgereinigten *Strep*-tags (10 μ M) zeigte hingegen keine Inhibition der Proteaseaktivität und diente als Negativ-Kontrolle für diesen und weitere Protease-Aktivitätstests (Abb. 17).

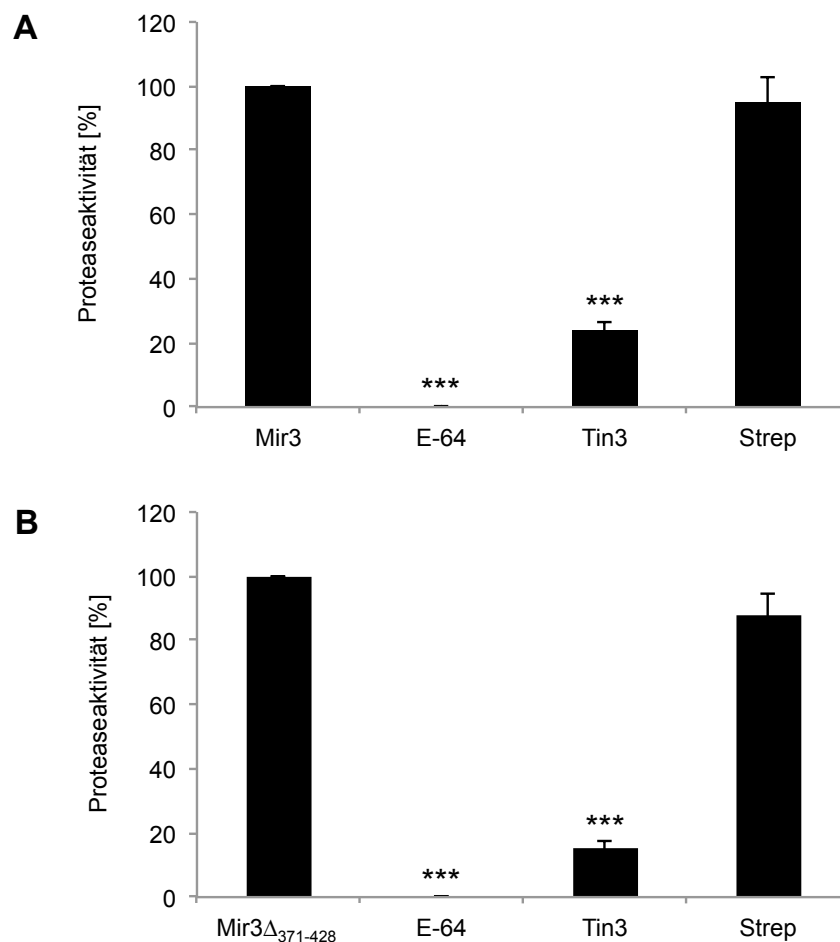


Abb. 17: ***In vitro* Protease-Aktivitätstest von Mir3 und Mir3 $\Delta_{371-428}$.** Die Proteaseaktivität der einzelnen Ansätze wurde in Prozent angegeben, wobei die Aktivität der Proteasen (**A** Mir3 und **B** Mir3 $\Delta_{371-428}$) als Referenz verwendet und deshalb gleich 100 % gesetzt wurde. Die Konzentration der Proteasen und des Tin3 Effektorproteins betrug 1 μ M, während die Konzentration des Cysteinprotease-Inhibitors E-64 und des aufgereinigten *Strep*-Tags 10 μ M betrug. Tin3 konnte hierbei die Aktivität von Mir3 und Mir3 $\Delta_{371-428}$ signifikant reduzieren. Die Graphen zeigen die Mittelwerte aus drei biologischen Replikaten, die \pm Standardabweichung dargestellt wurden. *** < 0,0005 signifikante Unterschiede zur ursprünglichen Proteaseaktivität.

Im *in vitro* Protease-Aktivitätstest der Volllängen-Mir3 Protease (1 μ M) konnte die Zugabe von 1 μ M Tin3 die Aktivität der Protease signifikant auf 24 % reduzieren und bestätigte somit die Proteaseinhibitor-Funktion von Tin3 *in vitro* (Abb. 17 A).

2.8.2 Tin3 ist kein Substrat der Cysteinprotease Mir3

Um die vermutete Inhibition der Proteaseaktivität durch Tin3 zu bestätigen, musste ausgeschlossen werden, dass Tin3 von Mir3 als Substrat verwendet werden kann. Dies wäre im Aktivitätstest durch die Konkurrenz zwischen Substrat und Tin3 nicht von einer Inhibition zu unterscheiden wäre. Hierfür wurden beide Proteine in gereinigter Form für 30 min inkubiert und in einer Zeitreihe in Bezug auf den Tin3-Abbau untersucht. Als Kontrolle wurde Tin3 in Puffer unter gleichen Bedingungen analysiert. Die Aktivität der Protease wurde zuvor in einem *in vitro* Aktivitätstest bestätigt (Abb. 17). Die Analyse der Proben mittels SDS-PAGE zeigte keinen Abbau von Tin3 in der Co-Inkubation mit Mir3 und konnte somit Tin3 als Substrat ausschließen (Abb. 18).

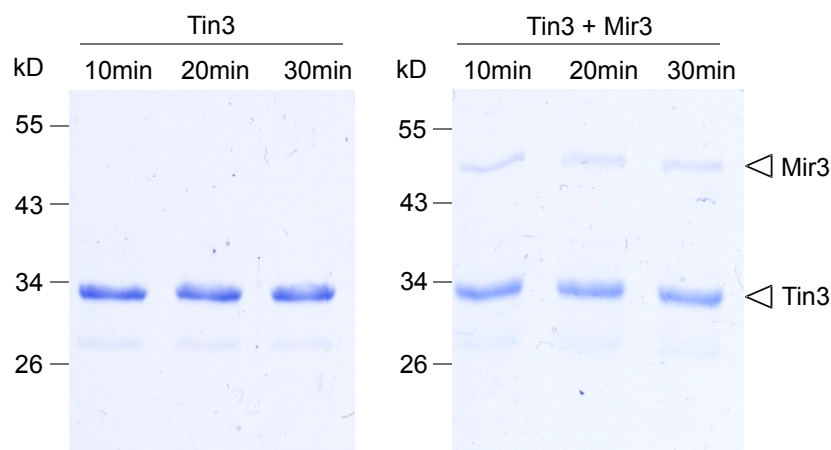


Abb. 18: **Assay zur proteolytischen Spaltung von Tin3 durch Mir3.** Tin3 wurde in einer Konzentration von 1 μ M eingesetzt und entweder mit Puffer oder mit der Protease Mir3 (0,5 μ M) co-inkubiert. Beide Ansätze wurden 30 min bei 30°C inkubiert und jeweils nach 10, 20 und 30 min wurden Proben entnommen, die durch SDS-PAGE analysiert wurden. Pfeilspitzen geben die detektierten Fusionsproteine an, der Größenstandard ist links angegeben. Das 34 kD Tin3 Protein zeigt in keinem Ansatz Abbauprodukte, die auf eine proteolytische Spaltung von Tin3 durch Mir3 hinweisen würden.

2.8.3 Tin3 inhibiert die Cysteinprotease CP1A und interagiert mit weiteren Maisproteasen

Durch Sequenzvergleiche konnte eine weitere Protease der C1 Familie identifiziert werden, die 92 % Identität zu Mir3 aufweist und auch als Abwehrreaktion der Pflanze in den Apoplasten sekretiert wird (van der Linde *et al.*, 2012). Eine Hefe Zwei-Hybrid

Analyse zeigte, dass Tin3 in der Lage ist mit dieser Protease zu interagieren. Dabei war die Stärke der Interaktion mit der Tin3-Mir3-Interaktion vergleichbar (Abb. 19 A). Die Aktivität der aufgereinigten, aktivierten Protease CP1A wurde durch Inkubation mit einem spezifischen Fluoreszenz-Substrat (Z-Phe-Arg-AMC) bestimmt. CP1A (1 μ M) zeigte eine spezifische Aktivität, die durch 10 μ M E-64 vollständig inhibiert werden konnte. Hingegen hatte gereinigter *Strep*-Tag (10 μ M) keinen Einfluss auf diese Aktivität (Abb. 19 B). Die Co-Inkubation mit Tin3 zeigte eine sehr effiziente Inhibition von CP1A auf eine Aktivität von 11 % (Abb. 19 B).

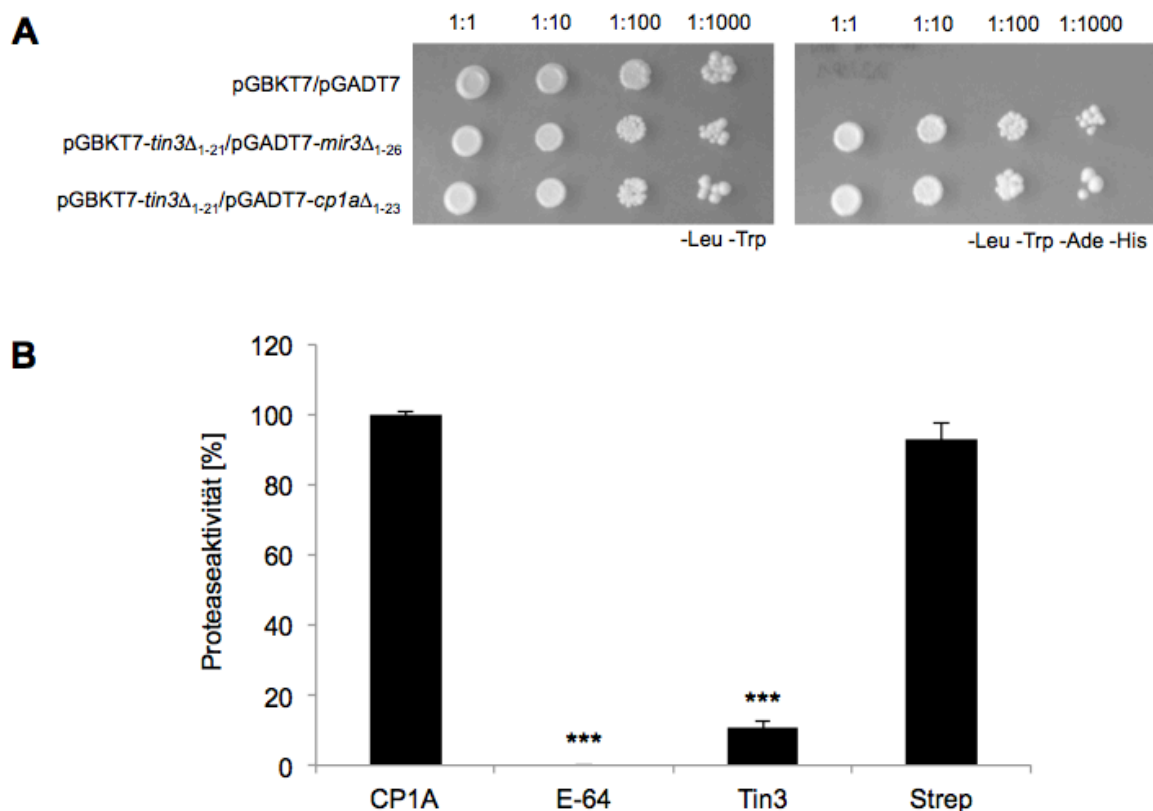


Abb. 19: **Hefe Zwei Hybrid-Analyse und *in vitro* Protease-Aktivitätstest von CP1A.** **A** Für die Hefe Zwei-Hybrid-Analyse wurden die angegebenen pGBKT7 und pGADT7 Derivate in den *S. cerevisiae* Stamm AH109 co-transformiert. Flüssigkulturen der entsprechenden Transformanten wurden anschließend in vier Verdünnungsstufen auf Kontrollplatten (SD -Leu -Trp) und Hochstringenzplatten (SD -Leu -Trp -Ade -His) getropft und für 4 Tage bei 28°C inkubiert. Tin3 konnte hierbei mit CP1A in gleichem Maße interagieren, wie schon für Mir3 gezeigt wurde. **B** Die Proteaseaktivität der einzelnen Ansätze wurde in Prozent angegeben, wobei die Aktivität der Protease CP1A als Referenz verwendet und deshalb gleich 100 % gesetzt wurde. Die Konzentration der Protease und des Tin3 Effektorproteins betrug 1 μ M, während die Konzentration des Cysteinprotease-Inhibitors E-64 und des aufgereinigten *Strep*-Tags 10 μ M betrug. Tin3 konnte die Aktivität von CP1A signifikant reduzieren. Die Graphen zeigen die Mittelwerte aus drei biologischen Replikaten, die \pm Standardabweichung dargestellt wurden. *** < 0,0005, * < 0,05 signifikante Unterschiede zur ursprünglichen Proteaseaktivität.

Um das Ergebnis des vorherigen Versuchs zu unterstützen, wurden weitere Proteasen auf Interaktion mit Tin3 getestet, die ebenfalls zur C1 Familie der Proteasen gehören und das

gleiche aktive Zentrum wie Mir3 und CP1A besitzen. Ein multipler Aminosäuresequenzvergleich dieser C1 Cysteinproteasen zeigte, dass die Proteasen sehr wenige konservierte Aminosäuren besitzen. Die katalytische Triade, die essenziell für die Interaktion mit Tin3 ist, gehört zu diesen identischen Aminosäuren (Abb. 20).

Mir3	1	-----maa--sttaaaaaavl-----l1llslargg-----glmsivsyge-----rtdeearmyaewmaahgrtynavgaee-----rryqvfrdnl
66281	1	-----maapasttaaaaaaall-----l1llslslaaa-----admsivsyge-----rsdeearmyaewmaahgrtynavgeee-----rryqvfrdnl
CP1A	1	-----maa--sttaaaaa--ll-----l1llslslaaa-----d--msivsyge-----rsxeearmyaewmaahgrtynavgeee-----rryqvfrdnl
CP1B	1	-----maa-----lgrglpll-----l1lllllavsgaanaaaagpgmsiityneehgarglertepevramydlvlaehgraynalgegegerdrflvfdnl
CP2	1	maprrllvlavval--aataaaaansgfadsnpirpvttraas-----alestvfaal-----grtrdair--farfavrygksyesaaevh-----krfrifsesl
XCP2	1	-----mkatyl-----glpkrtsgg-----rf-----ryggvg-----
Cathepsin B		-----
Mir3	73	ryidahnaaadagvhsfrlglnrfadltndeyratylgart-rpqrdrklgary-haadnedlpsvd---wraggavaevkdqsgsgc*atstiaaveginqivtgd
66281	75	ryidahnaaadagvhsfrlglnrfadltndeyratylgart-rpqrdrklgary-haadnedlpsvd---wraggavaevkdqsgsgc*atstiaaveginqivtgd
CP1A	70	ryidahnaaadagvhsfrlglnrfadltndeyratylgart-rpqrdrklgary-haadnedlpsvd---wraggavaevkdqsgsgc*atstiaaveginqivtgd
CP1B	90	rfdahner--agargfrlgmqfadtndefraaylgamypaargavgyerhrgaaaelpsvd---wreggavapvkngqsgc*atstiaaveginqivtgd
CP2	88	qlvrstnrk--gl-syrlginrfadmsveefratrlgaag-ncsatltgnhrm-raa-avalpetkd---wredgivspvkngqsgc*atstiaaveginqivtgd
XCP2	25	-----dgg-----devpasvd---wrkgavtevkngqsgsgc*atstiaaveginqivtgd
Cathepsin B	1	-----mnalsnvpvktyrsrl-----elpkefarsaawrcstignldqghsgc*atstiaaveginqivtgd
Mir3	177	lislseqelvdcdtsy-nq-gcngglmdyafefiinnggidtekd-----vpykgt dgrcdvnrk---nakv-vtidsyedvpandekslqkavan-q
66281	179	lislseqelvdcdtsy-nq-gcngglmdyafefiinnggidtekd-----vpykgt dgrcdvnrk---nakv-vtidsyedvpandekslqkavan-q
CP1A	174	lislseqelvdcdtsy-nq-gcngglmdyafefiinnggidtekd-----vpykgt dgrcdvnrk---nakv-vtidsyedvpandekslqkavan-q
CP1B	194	mvtlseqelvdcdtsy-nq-gcngglmdyafefiinnggidtekd-----vpyravgdkcdmnrk---nakv-vtidsyedvpandekslqkavan-q
CP2	187	pislseqelvdcdtsy-nq-gcngglmdyafefiinnggidtekd-----vpyravgdkcdmnrk---nakv-vtidsyedvpandekslqkavan-q
XCP2	74	ltslseqelvdcdtsy-nq-gcngglmdyafefiinnggidtekd-----vpylmeegdcddrar---dgelvtlsgyedvpandekslqkavan-q
Cathepsin B	66	silslvndllacgfmcc-gd-gcdggypleayrfvqngvvtdecdfydpvgckhpgcepaytpkcekkckeqnqvgqekkh-fsldayr-insdphdimaevykn-q
Mir3	263	pvsvaieaagtaqllyssgdtfgs-cgtr---ld-hvttavgygten-gkdywivnawgsswgesgyvrmerikassgkciavepsypkeganppnpgpspsptp
66281	265	pvsvaieaagtaqllyssgdtfgs-cgta---ld-hvttavgygten-gkdywivnawgsswgesgyvrmerikassgkciavepsypkeganppnpgpspsptp
CP1A	260	pvsvaieaagtaqllyssgdtfgs-cgta---ld-hvttavgygten-gkdywivnawgsswgesgyvrmerikassgkciavepsypkeganppnpgpspsptp
CP1B	281	pvsvaieaagtaqllyssgdtfgs-cgta---ld-hvttavgygten-gkdywivnawgsswgesgyvrmerikassgkciavepsypkeganppnpgpspsptp
CP2	274	pvsvaieaagtaqllyssgdtfgs-cgta---ld-hvttavgygten-gkdywivnawgsswgesgyvrmerikassgkciavepsypkeganppnpgpspsptp
XCP2	161	pvsvaieaagtaqllyssgdtfgs-cgta---ld-hvttavgygten-gkdywivnawgsswgesgyvrmerikassgkciavepsypkeganppnpgpspsptp
Cathepsin B	171	pvevaf-tvyedfahkagvykhi-tggi---mgshvklwgtstsdgedywillawngwdddyfkir---gkneegi-----eegrvagmpstkmvvpnf
Mir3	367	apa-vcdnyyscpdsttccciyeygkycfawgccplegatccddhyccphdypicnvrqgtslmgkdsplslsvkatkrtlak-----
66281	369	apa-vcdnyyscpdsttccciyeygkycfawgccplegatccddhyccphdypicnvrqgtslmgkdsplslsvkatkrtlakphwafsgntadgmksa
CP1A	364	apa-vcdnyyscpdsttccciyeygkycfawgccplegatccddhyccphdypicnvrqgtslmgkdsplslsvkatkrtlakphwafsgntadgmksa
CP1B	385	apdvcdnfscsagstcccafgfrnvlvgccpvegatccckhasccppgyvpcnvrqgtslmgkdsplslsvkatkrtlakphwafsgntadgmksa
CP2		-----dh-----
XCP2	248	-----dh-----
Cathepsin B	264	gga-v-----graiv-----

Abb. 20: Multipler Aminosäuresequenzvergleich der Mais Cysteinprotease Mir3 und verwandten Proteasen der C1 Familie. Die in allen Proteasen identischen Aminosäuren wurden in grau hinterlegt (As-Vergleich „Global Protein Alignment“/BLOSUM62 Matrix, Clonemanager 9.0). Aminosäuren des aktiven Zentrums wurden durch Sterne gekennzeichnet. Nur wenige Aminosäuren stimmen in allen sieben Proteasen überein. Des Weiteren besitzen Mir3, 66281, CP1A und CP1B C-Terminale Extensionen, bestehend aus einem Prolin-reichen Bereich und einer Granulin-Domäne.

Für die Hefe Zwei-Hybrid-Analyse wurde der *S. cerevisiae* Stamm AH109 mit pGBKT7-*tin3* Δ_{1-21} und den jeweiligen pGADT7 Derivaten der einzelnen Proteasen transformiert. Als Autoaktivierungskontrolle wurde der Leervektor pGBKT7 mit pGADT7-*zm66281* Δ_{1-28} co-transformiert. Die Autoaktivierungskontrolle der anderen Proteasen wurde von Liang Liang durchgeführt, wobei keine Autoaktivierung festgestellt wurde (Daten nicht gezeigt). Abb. 21 zeigte für alle getesteten Proteasen deutliches Wachstum auf Hochstringenzmedium, wobei jedoch deutliche Unterschiede in der Stärke des Wachstums zu erkennen waren. So war die Interaktion zwischen Tin3 und den Cysteinproteasen 66281, CP1A und CP1B sehr stark. Interessanterweise zeigten diese Proteasen eine hohe Identität zu Mir3; 66281 und CP1A mit 92 % und CP1B mit 58 %. Proteasen mit

geringeren Identitäten zu Mir3, wie CP2 mit 30 %, XCP2 mit 33 % und Cathepsin B mit 15 % zeigten eine deutlich schwächere Interaktion mit Tin3. Die Unterschiede in der Stärke des Wachstums könnten durch die unterschiedliche Expression der Proteine verursacht werden und sollte in einer Western-Blot Analyse untersucht werden. Diese Versuche zeigen, dass Tin3 ein effizienter Cysteinprotease-Inhibitor ist, der neben Mir3 weitere Proteasen der C1 Familie inhibiert.

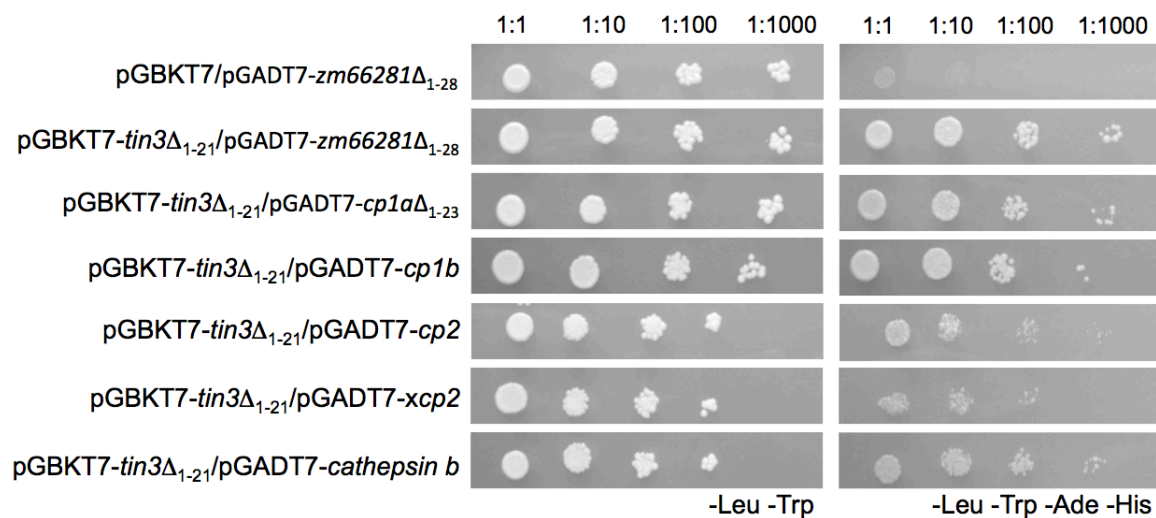


Abb. 21: **Interaktionsanalyse von Tin3 und Mir3-verwandten Cysteinproteasen.** Für die Hefe Zwei-Hybrid-Analyse wurde pGBKT7-*tin3* Δ_{1-21} mit den unterschiedlichen pGADT7 Derivaten der Proteasen in *S. cerevisiae* AH109 co-transformiert. Flüssigkulturen der entsprechenden Transformanten wurden anschließend in vier Verdünnungsstufen auf Kontrollplatten (SD -Leu -Trp) und Hochstringenzplatten (SD -Leu -Trp -Ade -His) getropft und für 4 Tage bei 28°C inkubiert. Tin3 war in der Lage mit allen getestet Cysteinproteasen zu interagieren, wobei die Interaktion mit 66281, CP1A und CP1B deutlich stärker war, wie die Interaktion mit CP2, XCP2 und Cathepsin B.

2.8.4 Tin3 inhibiert Proteasen in Pflanzenlysaten infizierter Maisblätter

Welche Auswirkungen die Inhibitor Funktion von Tin3 auf die *in vivo* Proteaseaktivität hat wurde in einem weiteren Aktivitätsassay getestet. Hierfür wurden Blattextrakte von SG200- und SG200 $\Delta tin3$ -infizierten Maispflanzen verwendet. Die Gesamt-Cysteinprotease-Aktivität wurde in einem Aktivitätstest mit spezifischem Fluoreszenz-Substrat bestimmt. Die Aktivität konnte durch E-64 vollständig inhibiert werden (Abb. 22), woraus geschlossen werden kann, dass es sich bei der gemessenen Aktivität um spezifische Aktivität von Cysteinproteasen handelt. Um sicher zu gehen wurden die Blattextrakte zuvor aber mit Proteaseinhibitoren behandelt, die die Aktivität von Serinproteasen und Metalloproteasen unterdrücken. Die Inkubation der Blattlysate mit Tin3 zeigte eine signifikante Hemmung sowohl für Extrakte aus SG200-infizierten als auch für Extrakte aus SG200 $\Delta tin3$ -infizierten Pflanzen (Abb. 22). Allerdings konnte auch ein größerer Teil der

Proteaseaktivität nicht gehemmt werden. Dies könnte einerseits durch den Überschuss an Proteasen im Pflanzenlysat erklärt werden, könnte aber auch andeuten, dass nicht alle Cysteinproteasen durch Tin3 hemmbar sind.

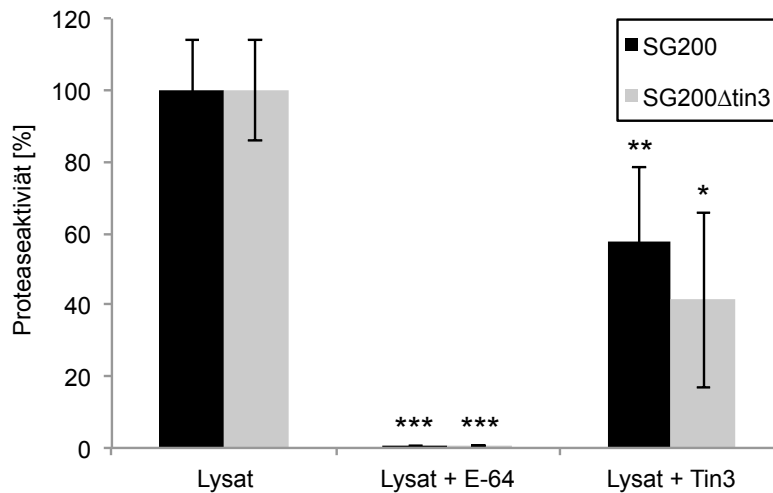


Abb. 22: **Protease-Aktivitätstest in Pflanzenlysaten von SG200- und SG200Δtin3-infizierten Maispflanzen.** Die Proteaseaktivität der einzelnen Ansätze wurde in Prozent angegeben, wobei die Aktivität der unbehandelten Pflanzenlysate als Referenz verwendet und deshalb gleich 100 % gesetzt wurde. Die Pflanzenlysate wurden auf 10 mg/ml Protein eingestellt; die Konzentration des Tin3 Effektorproteins betrug 1 µM, während die Konzentration des Cysteinprotease-Inhibitors E-64 10 µM betrug. Tin3 konnte die Aktivität von Cysteinproteasen in Pflanzenlysaten signifikant reduzieren. Die Graphen zeigen die Mittelwerte aus drei biologischen Replikaten, die ± Standardabweichung dargestellt wurden. *** < 0,0005, ** < 0,005, * < 0,05 signifikante Unterschiede zur ursprünglichen Proteaseaktivität.

2.8.5 Tin3 inhibiert Abwehr-induzierte apoplastische Cysteinproteasen

In vorherigen Versuchen konnte gezeigt werden, dass Tin3 mit apoplastischen Mais-Cysteinproteasen interagiert und diese auch effektiv inhibieren kann. Aus diesem Grund wurde zur Charakterisierung der *in vivo* Effekte von Tin3 auch die Proteaseaktivität in apoplastischer Flüssigkeit untersucht und für Inhibitionstests verwendet. Die Maisblätter wurden zuvor mit Salicylsäure infiltriert, was der Simulation von Stresssituationen diente, um die Abwehr-induzierten Proteasen in Mais zu induzieren. Diese Methode wurde nach van der Linde *et al.* (2012) verwendet. Die Apoplastenflüssigkeit wurde extrahiert und mittels Anionenaustauschchromatographie fraktioniert (Abb. 23).

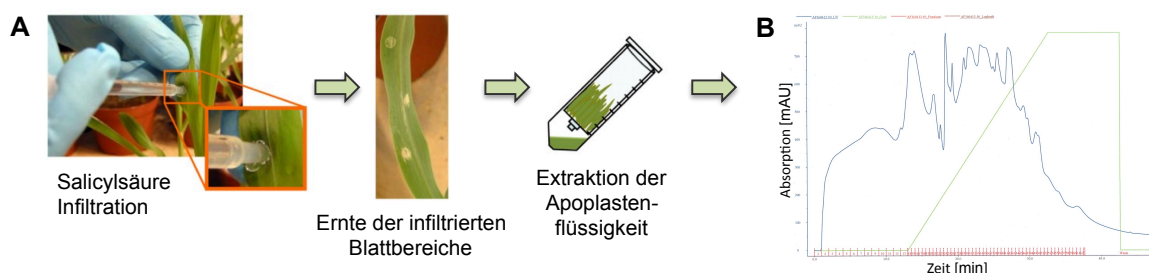


Abb. 23: **Präparation von Apoplastenflüssigkeit mit anschließender Fraktionierung durch Anionenaustauschchromatographie.** **A** Das dritte Blatt sieben Tage alter Maispflanzen wurde mit Salicylsäure infiltriert und die infiltrierten Bereiche nach zwei Tagen geerntet. Nach Vakuuminfiltration der geernteten Blattbereiche erfolgte die Extraktion der Apoplastenflüssigkeit. **B** Gezeigt ist ein Chromatogramm, welches während der Anionenaustauschchromatographie der apoplasten Flüssigkeit, aufgezeichnet wurde. Die blaue Linie stellt das UV-Absorptionsspektrum dar, welches mit der Proteinkonzentration korreliert. Der Konzentrationsverlauf des NaCl-Gradienten wird durch die grüne Linie angezeigt. Auf der x-Achse sind die einzelnen Fraktionen dargestellt. Die Abbildung wurde verändert nach van der Linde *et al.* (2012); der Versuch wurde in Zusammenarbeit mit André Müller durchgeführt.

Die Proteaseaktivität der einzelnen Fraktionen wurde in einem Protease-Aktivitätstest durch Inkubation mit einem spezifischen Fluoreszenz-Substrat (Z-Phe-Arg-AMC) bestimmt, wobei in Fraktionen 21 - 35 eine deutliche und zum Teil sehr hohe Proteaseaktivität gemessen wurde. Mit Ausnahme von Fraktionen 21 - 25 konnte die Aktivität durch Zugabe von 10 μ M E-64 vollständig inhibiert werden. Die Zugabe von 5 μ M Tin3 zeigte in sämtlichen aktiven Fraktionen eine Inhibition, wobei die Proteaseaktivität im Durchschnitt auf 27 % gesenkt wurde (Abb. 24).

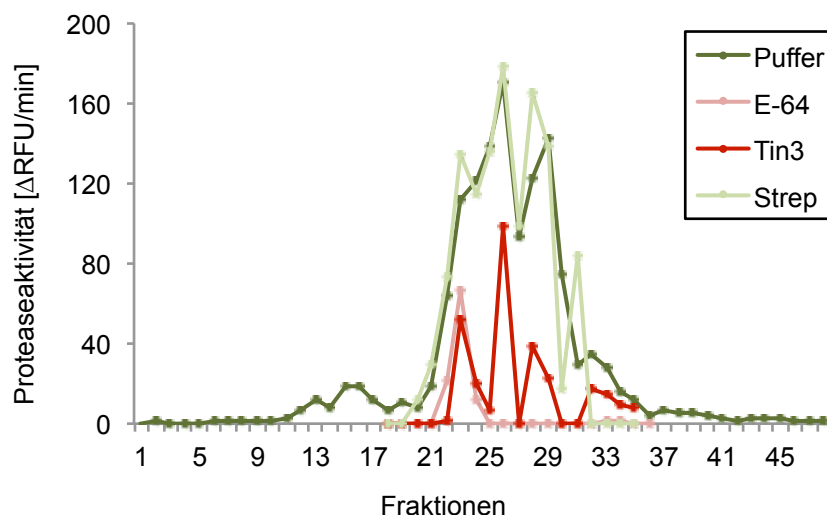


Abb. 24: **Protease-Aktivitätstest in apoplastischem Fluid Salicylsäure-infiltrierter Maisblätter.** Die extrahierte Apoplastenflüssigkeit (5 mg Gesamtprotein) wurde mittels Anionenaustauschchromatographie fraktioniert. Die Proteaseaktivität in den unterschiedlichen Fraktionen wurde mit einem spezifischen Fluoreszenz-Substrat (Z-Phe-Arg-AMC) bestimmt. Inhibitionstests wurden mit 10 μ M E-64 und 10 μ M Strep-Tag sowie 5 μ M Tin3 durchgeführt. Fraktionen 21 – 35 zeigten die höchste Proteaseaktivität, welche mit Ausnahme von Fraktionen 21-25 durch E-64 inhibiert werden konnte. Tin3 konnte die Aktivität in der eingesetzten Konzentration nur partiell hemmen.

Die Proteaseaktivität in einigen der aktiven Fraktionen konnten vollständig inhibiert werden (z. B. Fraktion 27 und 30), wohingegen andere nur zu 40 - 50 % inhibiert wurden (z. B. Fraktion 23 und 26). Die unterschiedlich starke Inhibition ist vermutlich auf die abweichende Protease Zusammensetzung in den einzelnen Fraktionen zurückzuführen und deutet erneut an, dass Tin3 möglicherweise nur einige der Cysteinproteasen inhibiert.

2.8.6 Tin3 inhibiert Cysteinproteasen durch Bindung an das aktive Zentrum

Zur Untersuchung des Wirkmechanismus und der Spezifität der Proteaseinhibitor-Funktion von Tin3 wurden Hefe Zwei-Hybrid-Analysen verwendet. Das erste Experiment sollte überprüfen, ob Tin3 in der Lage ist, mit einer inaktiven Form der Cysteinprotease Mir3 zu interagieren. Für diesen Zweck wurden die Aminosäuren C₁₅₇ und H₂₉₃ der katalytischen Triade mutiert, um so eine katalytisch inaktive Protease zu erhalten (de Haar *et al.*, 2004). Die Hefe Zwei-Hybrid-Analyse zeigte, dass die Substitution der beiden Aminosäuren durch G₁₅₇ bzw. D₂₉₃ ausreichte, um die Interaktion zwischen Tin3 und Mir3 zu verhindern; auf Hochstringenzmedium war kein Wachstum der *S. cerevisiae* Stämme zu erkennen (Abb. 25 A).

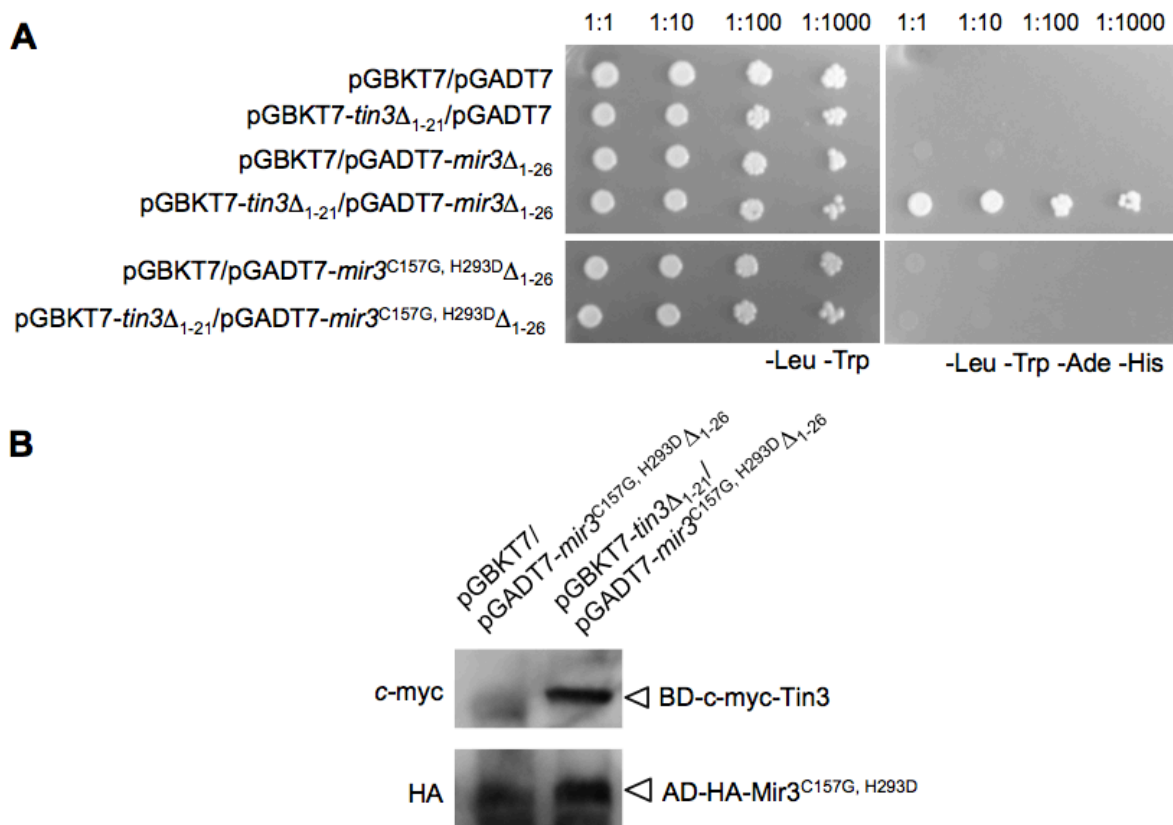


Abb. 25: Interaktionsanalyse von Tin3 mit katalytisch inaktiver Mir3 Protease (Mir3^{C157G, H293D}). **A** Für die Hefe Zwei-Hybrid-Analyse wurden die angegebenen pGBKT7 und pGADT7 Derivate in *S. cerevisiae* Stamm AH109 co-transformiert. Flüssigkulturen der entsprechenden Transformanten wurden anschließend in vier Verdünnungsstufen auf Kontrollplatten (SD -Leu -Trp) und Hochstringenzplatten (SD -Leu -Trp -Ade -His) getropft und für 4 Tage bei 28°C inkubiert. Tin3 war nicht in der Lage mit der mutierten Protease zu interagieren. **B** Western-Blot Analyse der *S. cerevisiae* Stämme. Das BD-c-myc-Tin3 Fusionsprotein wurde mittels anti-myc Antikörper, das AD-HA-Mir3^{C157G, H293D} Fusionsprotein mit anti-HA Antikörper nachgewiesen. Pfeilspitzen geben die detektierten Fusionsproteine an.

Um sicher zu stellen, dass sowohl das BD-c-myc-Tin3 als auch das AD-HA-Mir3^{C157G, H293D} Fusionsprotein in *S. cerevisiae* synthetisiert wurden zeigt Abb. 25 B eine Western-Blot Analyse, in der die Proteine immunologisch nachgewiesen wurden. Somit wurde sichergestellt, dass die fehlende Interaktion nicht auf das Fehlen der Fusionsproteine zurückzuführen ist. Insgesamt zeigt dieses Ergebnis, dass Tin3 das aktive Zentrum der Cysteinproteasen bindet und auf diese Weise mit Cysteinproteasen der C1 Familie interagiert.

2.8.7 Identifizierung der Tin3-Inhibitordomäne

Bisherige Experimente konnten zeigen, dass Tin3 durch die Bindung an das aktive Zentrum Mir3 inhibieren kann. Die folgenden Experimente dienten der Identifizierung der Domäne in Tin3, die für die Interaktion bzw. die Inhibition der Cysteinproteasen verantwortlich ist. Hierfür wurden verschiedene Deletionsmutanten des Tin3 Effektorproteins generiert und zur Komplementation des *tin3* Deletionsstamms verwendet. Im Vergleich zu SG200 zeigte die *tin3* Deletionsmutante wie schon zuvor beschrieben (Thomas Brefort, pers. Mitteilung) eine stark reduzierte Virulenz. Die Komplementationsstämme die entweder nur die konservierte Region (Tin3 $\Delta_{22-54, 100-265}$), den vollständigen N-Terminus (Tin3 $\Delta_{100-265}$) oder Tin3 ohne konservierte Region (Tin3 Δ_{55-99}) exprimierten, zeigten alle eine teilweise Komplementation des *tin3* Virulenzphänotyps, die aber in keinem der Stämme mit dem Ausgangsstamm SG200 vergleichbar war (Abb. 26 B). In den Komplementationen mit Tin3 $\Delta_{22-54, 100-265}$ und Tin3 Δ_{55-99} konnten im Vergleich zur Deletionsmutante signifikant mehr Tumor-induzierte Krümmungen der Sproßachse beobachtet werden, wohingegen mit Tin3 $\Delta_{100-265}$ keine signifikanten Veränderungen beobachtet werden konnten (Abb. 26 A). Repräsentative Blätter wurden in Abb. 26 B dargestellt. Auch hier wird die partielle Komplementationsstämme deutlich. Insgesamt konnte diese Deletionsanalyse allerdings keine einzelne Domäne identifizieren, die für die vollständige Virulenz und somit für die Funktion verantwortlich ist.

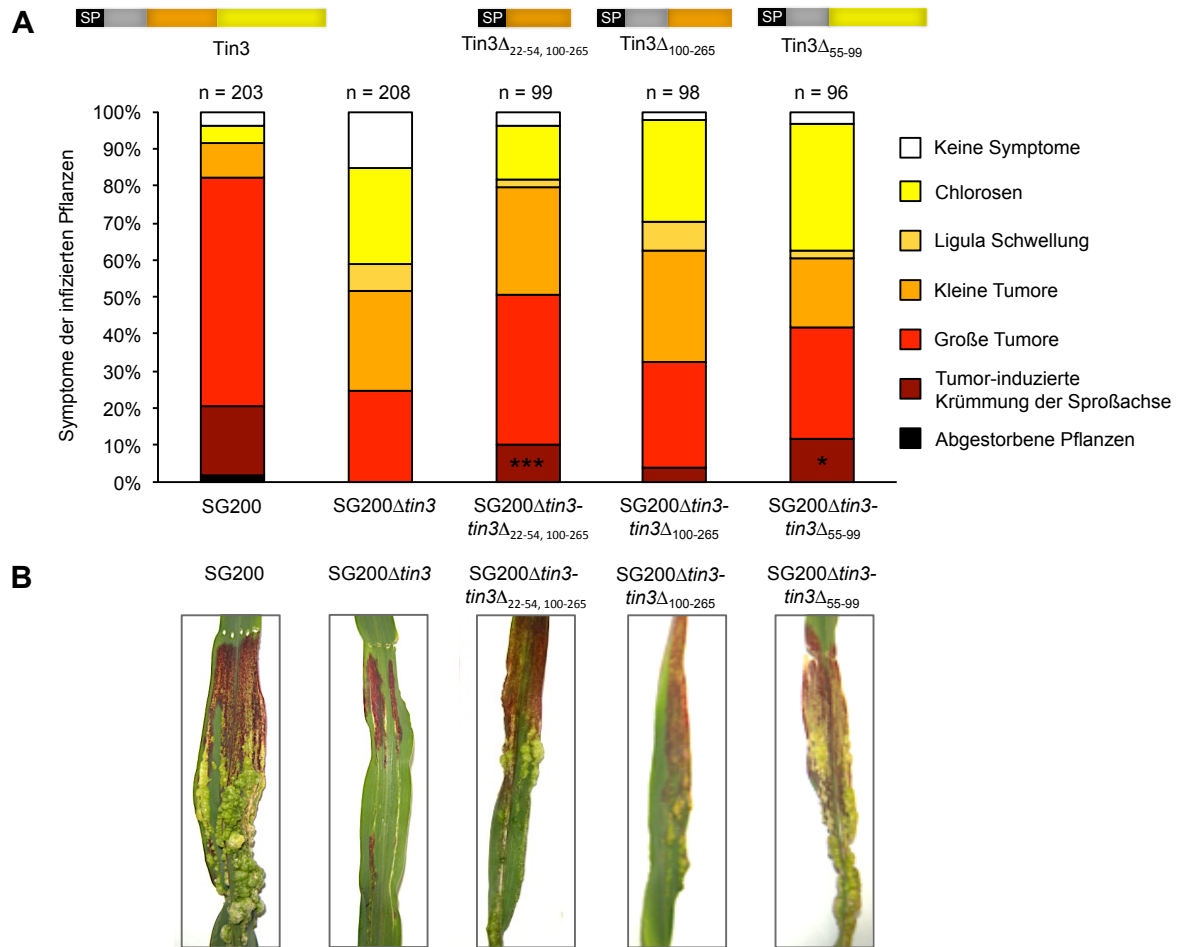


Abb. 26: Virulenz von SG200, SG200 $\Delta tin3$ und Komplementationsstämmen SG200 $\Delta tin3-tin3\Delta_{22-54, 100-265}$, SG200 $\Delta tin3-tin3\Delta_{100-265}$ und SG200 $\Delta tin3-tin3\Delta_{55-99}$. **A** Quantifizierung der Pflanzensymptome zwölf Tage nach Infektion mit SG200, SG200 $\Delta tin3$, SG200 $\Delta tin3-tin3\Delta_{22-54, 100-265}$, SG200 $\Delta tin3-tin3\Delta_{100-265}$ und SG200 $\Delta tin3-tin3\Delta_{55-99}$. Dabei wurden die Symptome in sieben Kategorien eingeteilt (Kämper *et al.*, 2006), die in der Abbildung angegeben wurden. Drei biologische Replikate wurden kombiniert, gemittelt und als prozentualer Anteil der Gesamtanzahl der Pflanzen (n) dargestellt. *** < 0,0005, * < 0,05 signifikante Unterschiede zwischen SG200 $\Delta tin3$ und den Komplementationsstämmen. Alle drei Komplementationsstämmen konnten den Phänotyp der Deletionsmutante teilweise wiederherstellen. Allerdings konnten nur mit Tin3 $\Delta_{22-54, 100-265}$ und Tin3 Δ_{55-99} signifikante Unterschiede in Bezug auf Tumor-induzierte Krümmungen der Sprossachse festgestellt werden. **B** Die angegebenen Stämme wurden in sieben Tage alte Maispflanzen injiziert. Repräsentative Blätter zwölf Tage nach Infektion sind gezeigt.

Aus diesem Grund wurden einzelne, synthetisierte Bereiche (Centic Biotech, Weimar) für Protease-Inhibitionstests verwendet. Leider konnte der C-Terminus von Tin3 nicht heterolog hergestellt und aufgereinigt werden (Daten nicht gezeigt) und war somit für den Aktivitätstest nicht verfügbar. Der N-Terminus von Tin3 (Tin3 $\Delta_{1-21, 55-265}$) sowie der konservierte Bereich (Tin3 $\Delta_{1-54, 100-265}$) zeigten keine Inhibition der Protease Mir3 und konnten deshalb als Inhibitor Domäne ausgeschlossen werden (Abb. 27). Aus diesem Grund ist zu vermuten, dass entweder der C-terminale Bereich für diese Funktion verantwortlich ist oder das gesamte Protein aus sterischen Gründen benötigt wird.

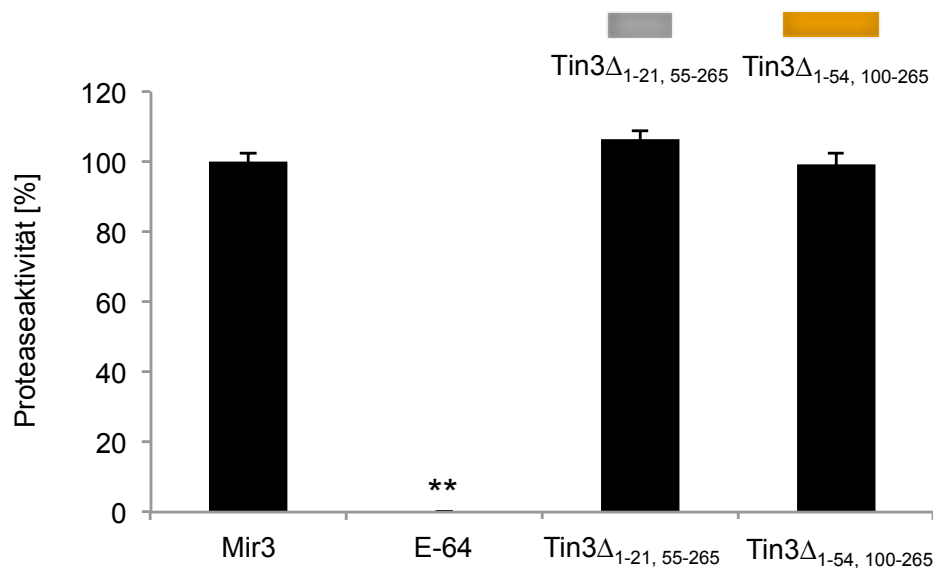


Abb. 27: **In vitro Protease-Aktivitätstest und Inhibition von Mir3 durch verkürzte Derivate von Tin3.** Die Proteaseaktivität der einzelnen Ansätze wurde als prozentualer Anteil zur Aktivität von Mir3 angegeben. Diese diente als Referenz und wurde deshalb gleich 100 % gesetzt. Die Konzentration der Protease und der verkürzten Tin3-Derivaten betrug 1 μ M, während die Konzentration des Cysteinprotease-Inhibitors E-64 10 μ M betrug. Tin3 $\Delta_{1-21, 55-265}$ und Tin3 $\Delta_{1-54, 100-265}$ konnten hierbei die Aktivität von Mir3 nicht reduzieren. Die Graphen zeigen die Mittelwerte aus drei biologischen Replikaten, die \pm Standardabweichung dargestellt sind. ** < 0,005 signifikante Unterschiede zur ursprünglichen Proteaseaktivität.

2.8.8 Die Proteaseinhibitor-Funktion von Tin3 wird für die Virulenz benötigt

Um die biologische Relevanz der Proteaseinhibitor-Funktion von Tin3 festzustellen wurde versucht die *tin3* Deletionsmutante funktionell durch einen anderen, bereits bekannten Proteaseinhibitor zu komplementieren. Zunächst wurde EPIC1 verwendet, ein Cysteinproteaseinhibitor aus *P. infestans*, der Mir3-verwandte Proteasen wie zum Beispiel C14 (59 % Identität zu Mir3) oder Rcr3 inhibiert (Song *et al.*, 2009; Kaschani *et al.*, 2010). Um auszuschließen, dass EPIC1 grundsätzlich einen positiven Effekt für *U. maydis* hat wurde eine weitere Deletionsmutante (SG200 $\Delta tin2$) mit EPIC1 komplementiert. Das für EPIC1 codierende Gen wurde für *U. maydis* Codon-optimiert und unter Kontrolle des nativen *tin3*-Promotors als Einzelkopie in den *ip*-Locus von SG200 $\Delta tin3$ integriert. Axenische Flüssigkulturen von SG200, SG200 $\Delta tin3$, SG200 $\Delta tin3$ -*epic1*, SG200 $\Delta tin2$ und SG200 $\Delta tin2$ -*epic1* wurden in sieben Tage alte Maispflanzen injiziert und zwölf Tage nach Infektion auf spezifisch induzierte Symptome der Maispflanzen untersucht. Die Komplementation der *tin3* Mutante konnte die Symptome des Ausgangsstamms SG200 teilweise wiederherstellen, allerdings waren die Veränderungen statistisch nicht signifikant (Abb. 28 A). Die Komplementation der *tin2* Mutante zeigte keinerlei Veränderung und

konnte somit einen generellen Vorteil des Proteaseinhibitors EPIC1 für Virulenz ausschließen (Abb. 28 A). Auch repräsentative Blätter bestätigten die teilweise Komplementation durch EPIC1 (Abb. 28 B).

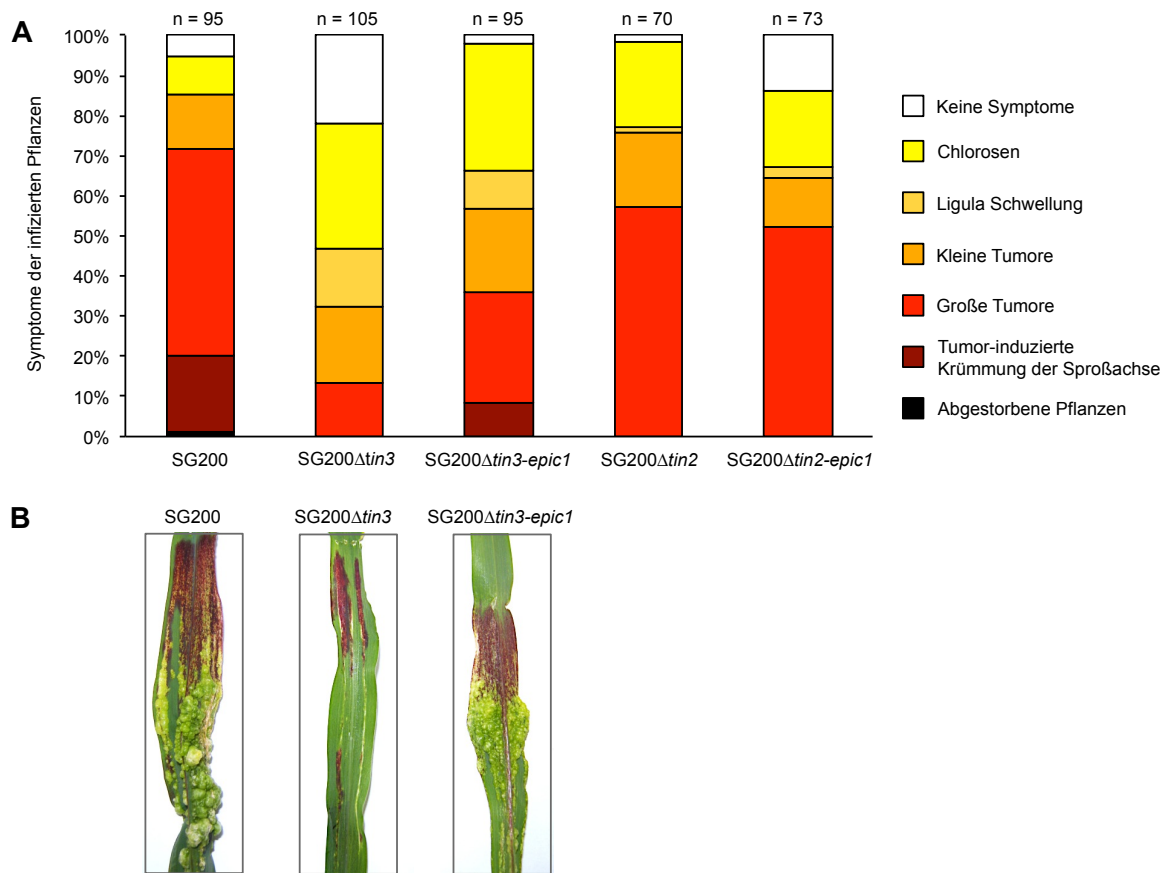


Abb. 28: **Virulenz von SG200, SG200Δtin3 und Komplementationsstamm SG200Δtin3-epic1.** **A** Quantifizierung der Pflanzensymptome zwölf Tage nach Infektion mit SG200, SG200Δtin3, SG200Δtin3-epic1. Als Kontrollstämme wurden SG200Δtin2 und SG200Δtin2-epic1 verwendet. Dabei wurden die Symptome in sieben Kategorien eingeteilt (Kämper *et al.*, 2006), die rechts aufgeführt sind. Drei biologische Replikate wurden kombiniert, gemittelt und als prozentualer Anteil der Gesamtanzahl der Pflanzen (n) dargestellt. Die Tin2 Stämme wurden jeweils nur in 2 Replikaten durchgeführt. Die Komplementation mit EPIC1 konnte einen Großteil der Symptome des Ausgangsstamms wiederherstellen. Allerdings konnten dabei keine signifikanten Änderungen festgestellt werden. Die Komplementation der *tin2* Mutante zeigte keine Veränderung. **B** Die angegebenen Stämme wurden in sieben Tage alte Maispflanzen injiziert. Repräsentative Blätter zwölf Tage nach Infektion sind gezeigt.

Da EPIC1 von *P. infestans* die *tin3* Mutante wenn überhaupt nur teilweise komplementieren konnte, wurde ein weiteres Experiment durchgeführt bei dem SG200Δtin3 mit einem bekannten Proteaseinhibitor, Pit2, aus *U. maydis* komplementiert wurde (Müller *et al.*, 2013). Das für Pit2 codierende Gen wurde unter Kontrolle des nativen *tin3*-Promotors als Einzelkopie in den *ip*-Locus von SG200Δtin3 integriert. Axenische Kulturen von SG200, SG200Δtin3 und SG200Δtin3-pit2 wurden in sieben Tage alte Maispflanzen injiziert; die Symptome der Pflanzen wurden zwölf Tage nach der

Infektion untersucht. Pit2 war in der Lage, die Virulenz der *tin3* Deletionsmutante signifikant zu komplementieren (Abb. 29). Die nicht vollständige Komplementation durch *pit2* lässt auf Unterschiede in der Spezifität schließen. Des Weiteren könnte dies auch durch eine zweite Funktion des Effektors erklärt werden.

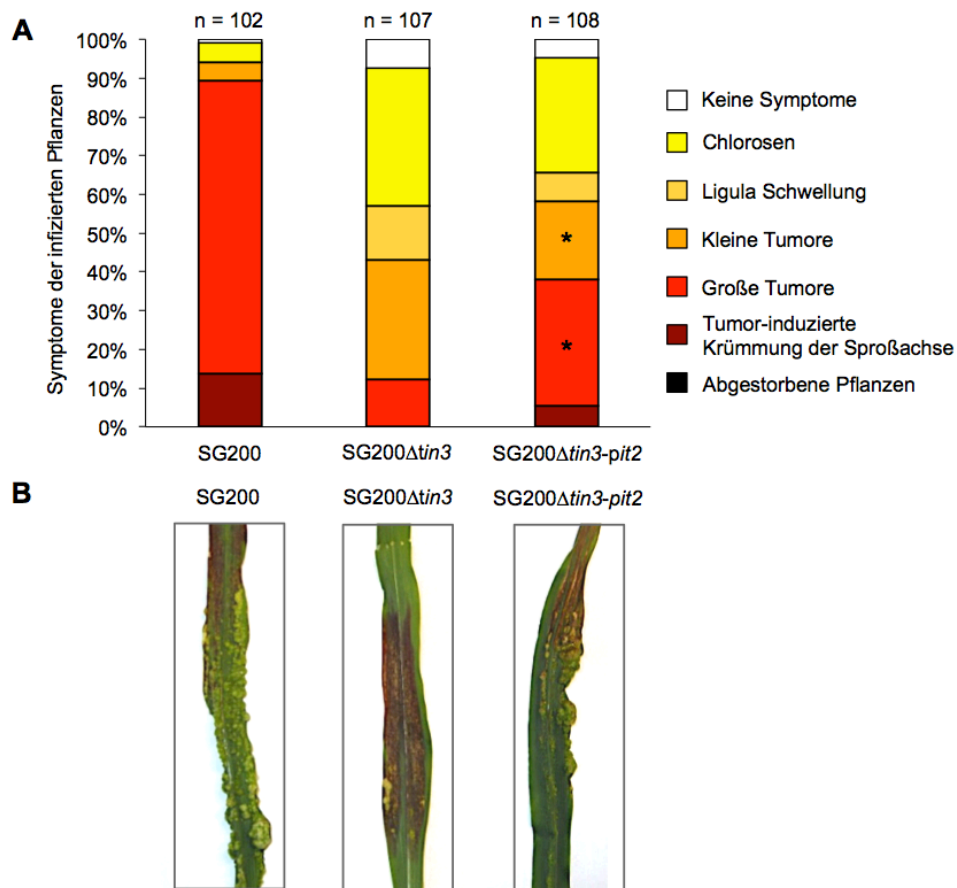


Abb. 29: **Virulenz von SG200, SG200 Δ *tin3* und dem Komplementationsstamm SG200 Δ *tin3-pit2*.** **A** Quantifizierung der Pflanzensymptome zwölf Tage nach Infektion mit SG200, SG200 Δ *tin3*, SG200 Δ *tin3-pit2*. Dabei wurden die Symptome in sieben Kategorien eingeteilt (Kämper *et al.*, 2006), die in der Legende angegeben wurden. Drei biologische Replikate wurden kombiniert, gemittelt und als prozentualer Anteil der Gesamtanzahl der Pflanzen (n) dargestellt. Die Komplementation mit *pit2* konnte einen Großteil der Symptome des Ausgangsstamms signifikant wiederherstellen. * < 0,05 signifikante Unterschiede zwischen SG200 Δ *tin3* und dem Komplementationsstamm. **B** Die angegebenen Stämme wurden in sieben Tage alte Maispflanzen injiziert. Repräsentative Blätter zwölf Tage nach Infektion sind gezeigt.

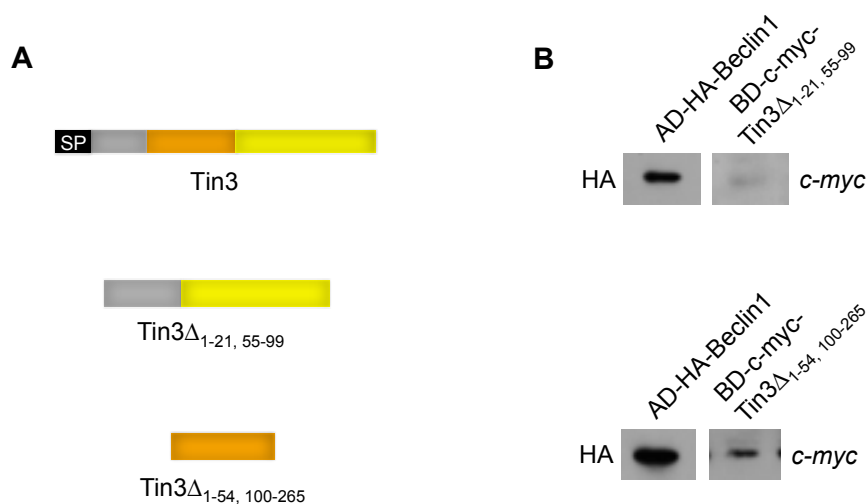
2.9 Effektorprotein Tin3 als Autophagie-Inhibitor

Die Komplementationsstudien hatten gezeigt, dass der N-Terminus von Tin3 den Phänotyp der *tin3* Deletionsmutante teilweise komplementieren konnte, nicht aber für die Proteaseinhibitor-Funktion von Tin3 verantwortlich gemacht werden konnte. Dies führte zu der Annahme, dass dieser konservierte Bereich eine zweite Funktion ausüben könnte. Ferner konnte die biologische Relevanz der Inhibitor-Funktion zwar durch die

Komplementation der *tin3* Mutante mit einem anderen Proteaseinhibitor gezeigt werden, jedoch war die Komplementation nicht vollständig. Auch diese Beobachtung lies die Vermutung einer zweiten Funktion für Tin3 zu. In vorherigen Hefe Zwei-Hybrid-Analysen wurde neben der Cysteinprotease Mir3 das Autophagie-Protein Beclin1 als weiterer möglicher Interaktionspartner von Tin3 identifiziert (Thomas Brefort, pers. Mitteilung). Ausgehend von dieser Überlegung wurden Experimente durchgeführt, um die Interaktion von Tin3 und Beclin1 genauer zu charakterisieren. Die Tin3 Interaktionsdomäne mit Beclin1 wurde in Hefe Zwei-Hybrid-Analysen untersucht. Der Einfluss von Tin3 auf den Autophagie-Prozess wurde einerseits durch Untersuchungen in *S. cerevisiae* andererseits durch *in vivo* Färbemethoden nach Infektion von Maispflanzen analysiert. Zusätzlich wurden Expressionstudien unterschiedlicher pflanzlicher Autophagiegene ermittelt.

2.9.1 Der konservierte Bereich von Tin3 interagiert mit dem Autophagie-Protein Beclin1

Durch vorherige Hefe Zwei-Hybrid-Analysen konnte bereits gezeigt werden, dass das Tin3 Volllängen-Protein mit Beclin1 interagiert (Abb. 13). Da vermutet wurde, dass der konservierte Bereich im N-Terminus von Tin3 für die zweite Funktion verantwortlich sein könnte, wurde eine *tin3* Deletionsmutante generiert, in welcher der konservierte Bereich deletiert wurde (*tin3* $\Delta_{1-21, 55-99}$) und andererseits ein Konstrukt generiert, das nur für den konservierten Bereich codiert (*tin3* $\Delta_{1-54, 100-265}$, Abb. 30 A). Die Analyse zeigt, dass die konservierte Domäne von Tin3 für die Interaktion mit Beclin1 verantwortlich ist (Abb. 30 C). Zur Bestätigung dieser Ergebnisse wurde eine Western-Blot Analyse mit den verwendeten Stämmen durchgeführt, wodurch die korrekte Synthese aller Fusionsproteine gezeigt werden konnte (Abb. 30 B).



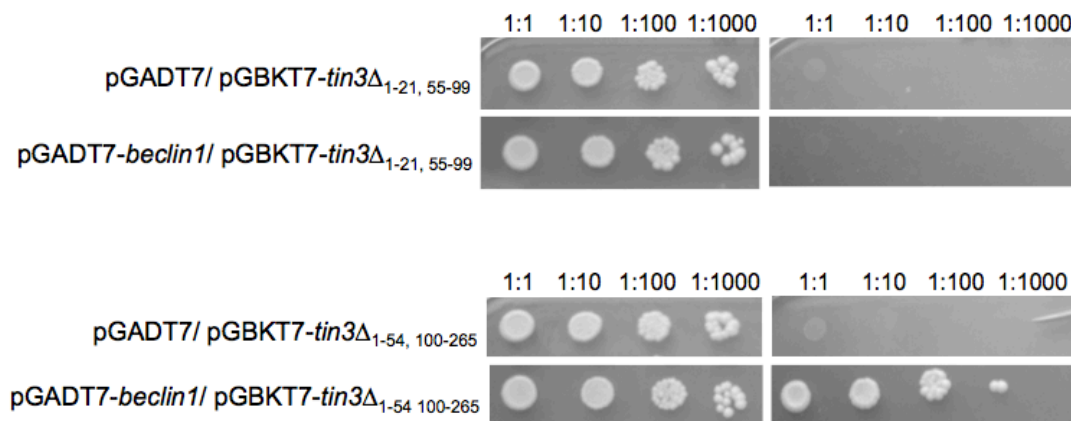
C

Abb. 30: **Hefe Zwei-Hybrid-Analyse zur Identifizierung der Interaktionsdomäne zwischen Tin3 und Beclin1.** **A** Domänenstruktur von Volllängen-Tin3 und den verwendeten verkürzten Proteinen Tin3 $\Delta_{1-21,55-99}$ und Tin3 $\Delta_{1-54,100-265}$. **B** Western-Blot Analyse der *S. cerevisiae* Stämme. Die Tin3 Fusionsproteine wurde mit Hilfe von anti-myc Antikörpern; das Beclin1 Fusionsprotein mit anti-HA Antikörpern nachgewiesen. **C** Hefe Zwei-Hybrid-Analyse zwischen Tin3 $\Delta_{1-21,55-99}$ und Tin3 $\Delta_{1-54,100-265}$ und Beclin1. Zur Kontrolle der Autoaktivierung wurden die Tin3 Deletionsderivate mit dem Leervektor co-transformiert. Flüssigkulturen der mit den angegebenen Plasmiden co-transformierten *S. cerevisiae* Stämme wurden anschließend in vier Verdünnungsstufen auf Kontrollplatten (SD -Leu -Trp) und Hochstringenzplatten (SD -Leu -Trp -Ade -His) getropft und für 4 Tage bei 28°C inkubiert. Nur Tin3 $\Delta_{1-54,100-265}$ zeigte Wachstum auf Hochstringenzmedium und somit eine Interaktion mit Beclin1.

Mais Beclin1 und Atg6 aus *S. cerevisiae* zeigen eine Aminosäureidentität von nur 22 % und es war daher fraglich, ob das Maisprotein die Funktion des Hefeproteins übernehmen kann. Um dies zu testen wurde die *S. cerevisiae atg6* Deletionsmutante BY4741 $\Delta atg6$ (YPL120w) mit *beclin1* komplementiert. Hierfür wurde *beclin1* in das frei replizierende Plasmid pVTU260 integriert, wodurch das Gen unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven *ADHI* Promotors stand und am 5'-Ende mit einem *his*-Epitop fusioniert wurde. Als Transformations-Kontrolle wurde der pVTU260-Leervektor verwendet. Des Weiteren sollte mit diesem Versuch die Auswirkung von Tin3 bzw. der konservierten Domäne von Tin3 auf die Bildung von Autophagosomen untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde der Hefestamm BY4741 $\Delta atg6$ mit *pVTU₂₆₀-beclin1* (His-Beclin1) und pGADT7-*tin*²²⁻⁹⁹ (Tin3 $\Delta_{1-54,100-265}$ -3xHA) bzw. pGADT7-*tin3* Δ_{1-21} (Tin3 Δ_{1-21} -3xHA) co-transformiert. Die verkürzten Tin3 Derivate wurden dafür in pGADT7-GW-3xHA integriert und so am C-Terminus mit dem 3xHA Epitop fusioniert. In pGADT7-GW-3xHA erfolgt die Expression der Gene unter der Kontrolle des *ADHI* Promotors. Die generierten *S. cerevisiae* Stämme wurden über Nacht in YEPD Medium angezogen und am nächsten Tag in SD(-N)-Medium überführt, um die Zellen unter Stickstoffmangel zu setzen. Anschließend wurden die Stämme zusammen mit PMSF inkubiert, um den Abbau von Autophagosomen in

Vakuolen zu verhindern (Liang *et al.*, 1999). Dies sollte die Visualisierung und quantitative Auswertung der Autophagosomenproduktion ermöglichen. Die mikroskopische Analyse zeigte deutlich den Unterschied zwischen Wildtyp und der *atg6* Deletionsmutante, letztere wies in den Vakuolen kaum Autophagosomen auf (Abb. 31 A). In BY4741 Δ *atg6-beclin1* waren hingegen Autophagosomen zu erkennen, was für eine erfolgreiche Komplementation sprach (Abb. 31 A).

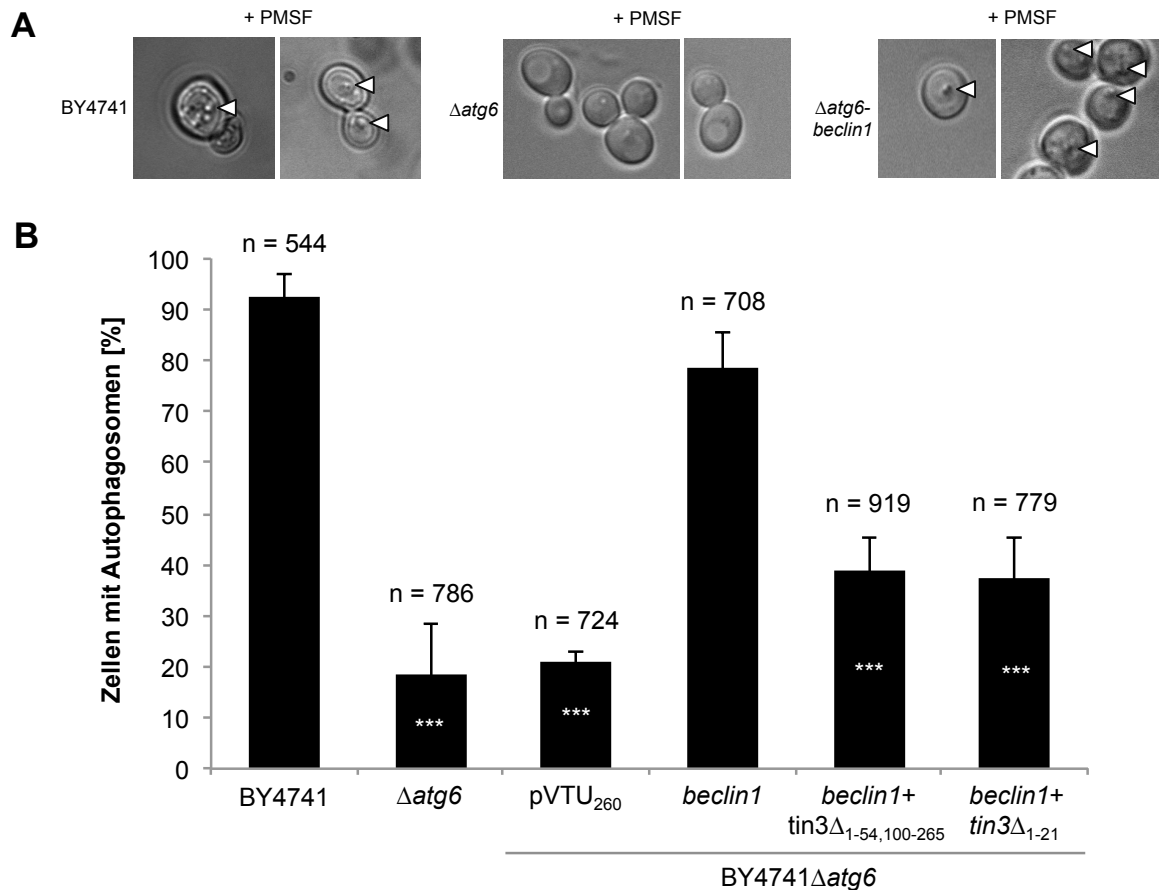


Abb. 31: Die Auswirkung von Tin3 auf die Bildung von Autophagosomen in *S. cerevisiae*.

A Repräsentative Mikroskopiebilder des Wildtypstamms BY4741, der *atg6* Deletionsmutante (Δ *atg6*) und des Komplementationsstamms (Δ *atg6-beclin1*) nach vier Stunden Stickstoffmangel und PMSF Zugabe. Zellen mit einem oder mehr Autophagosomen in der Vakuole wurden als positiv gewertet (siehe Pfeile). Hierbei wird deutlich, dass die Komplementation mit *beclin1* den Defekt der *atg6* Deletionsmutante ausgleichen konnte. **B** Für die Auswertung der mikroskopischen Analyse wurden Flüssigkulturen der angegebenen Stämme vier Stunden unter Stickstoffmangel mit PMSF inkubiert. Die Anwesenheit von Autophagosomen wurde in fünf bis sieben Replikaten pro Stamm untersucht, gemittelt und als prozentualer Anteil zur Gesamtzellzahl angegeben. Dabei ist die offensichtliche Komplementation der *atg6* Mutante durch *beclin1* zu erkennen, sowie der Inhibitor-Effekt von Tin3 Δ _{1-54,100-265} und Tin3 Δ ₁₋₂₁ in den Co-Expressionen mit Beclin1. Die Leervektor-Kontrolle zeigte keinen Effekt. Die Graphen zeigen die Mittelwerte der biologischen Replikate, die \pm Standardabweichung dargestellt sind. *** < 0,0005 signifikante Unterschiede zum Wildtyp Hefestamm BY4741.

Die quantitative Auswertung der lichtmikroskopischen Untersuchung zeigte für den Wildtyp Hefestamm BY4741, dass in mehr als 90 % der untersuchten Zellen

Autophagosomen vorhanden waren (Abb. 31 B). In Zellen des *atg6* Deletionsstamms konnten, obwohl *atg6* deletiert war, noch in 19 % der Zellen einige Autophagosomen beobachtet werden (Abb. 31 B). Im Vergleich zum Wildtypstamm ist dies dennoch ein drastischer Unterschied. Die Produktion von Autophagosomen konnte durch die Expression von *beclin1* in der *atg6* Mutante fast vollständig komplementiert werden und identifizierte somit Beclin1 als ein funktionelles Homolog von Atg6. Bei Co-Expression von Beclin1 und den Tin3 Derivaten reduzierte sich die Zahl der Zellen mit Autophagosomen auf circa 40 %. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass Tin3 bzw. die konservierte Domäne alleine, über die Interaktion mit Beclin1, die Bildung von Autophagosomen inhibiert. An dieser Stelle muss noch erwähnt werden, dass die Wachstumskurven der verwendeten Stämme sehr unterschiedlich waren. So konnten alle Stämme, in denen Proteine exprimiert wurden, im Vergleich zu BY4741 und BY4741 Δ *atg6* besser in SD(-N)-Medium wachsen (Daten nicht gezeigt). Da dieser Sachverhalt nicht erklärt werden konnte, wurden die weiteren Experimente im natürlichen System durchgeführt, um eventuelle Nebeneffekte zu vermeiden.

2.9.2 Pflanzliche Autophagie-Gene sind in SG200 Δ *tin3*-infizierten Maisblättern induziert

Der Hefe-Autophagie-Assay gab erste Hinweise für eine mögliche Funktion von Tin3 als Autophagie-Inhibitor. Um dieses Ergebnis weiter zu verfolgen wurde mittels qPCR eine Expressionanalyse von vier unterschiedlichen pflanzlichen Autophagie-Genen durchgeführt. *beclin1*, *atg8*, *atg9* und *atg12* wurden ausgewählt, da bereits in Mikroarray Studien von *Arabidopsis thaliana* Pflanzen gezeigt worden war, dass diese Gene transkriptionell induziert werden (Zimmermann *et al.*, 2004; Lenz, 2011). Als Probenmaterial wurde ein 2 cm langer Bereich 2 cm unterhalb der Infektionsstelle des dritten Blatts von SG200 und SG200 Δ *tin3* infizierten Maispflanzen 30 Stunden nach Infektion geerntet. Dabei wurden jeweils zehn Blattbereiche vereint und durch Mörsern homogenisiert. Die Hälfte des Blattmaterials wurde anschließend für die qPCR verwendet, um die relative Expression der Gene zu bestimmen, die andere Hälfte wurde für die Quantifizierung der Pilzbiomasse verwendet, um schließlich die relative Expression bezogen auf Pilzbiomasse darstellen zu können (Abb. 32). Insgesamt zeigte dieses Experiment, dass die relative Expression bezogen auf Pilzbiomasse für alle getesteten Autophagiegene in der *tin3* Deletionsmutante erhöht war (Abb. 32). Dabei waren die Gene

in SG200 $\Delta tin3$ -infizierten Blättern im Vergleich zu SG200-infizierten Blättern 4 – 7-fach induziert (Abb. 32). Dieses Ergebnis einer erhöhten transkriptionellen Aktivität von Autophagiegengen nach Infektion mit SG200 $\Delta tin3$ deutet auf eine mögliche Inhibition der Autophagie durch das Tin3 Effektorprotein hin.

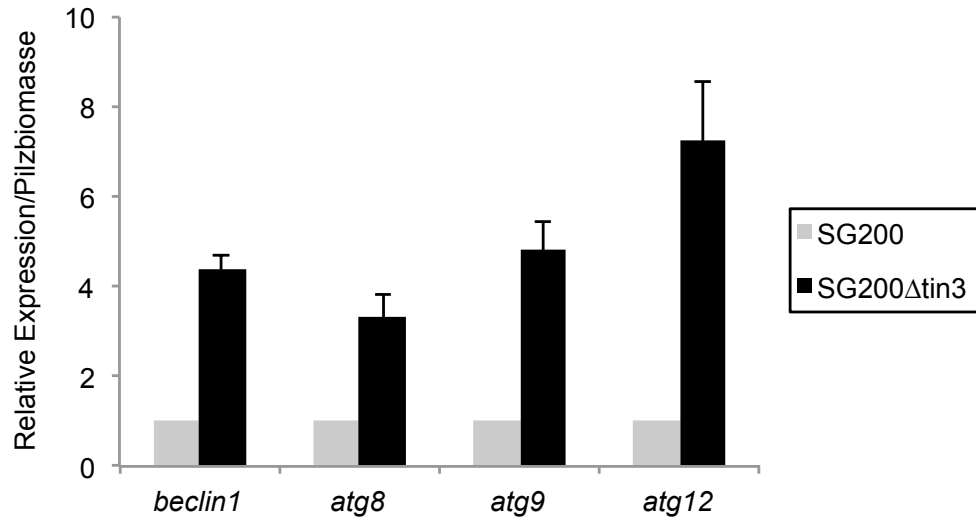


Abb. 32: **Expression von pflanzlichen Autophagiegengen nach Infektion mit *U. maydis*.** RNA wurde von SG200- und SG200 $\Delta tin3$ -infizierten Maisblättern (30 hpi) extrahiert und in cDNA revers transkribiert. Die relative Expression von *beclin1*, *atg8*, *atg9* und *atg12* im Verhältnis zum konstitutiv exprimierten Pflanzengen *GAPDH* wurde mittels qPCR bestimmt, wobei die Expression der Autophagiegene in SG200 als Referenz verwendet und deshalb gleich 1 gesetzt wurde. Die Quantifizierung der relativen Pilzbiomasse durch qPCR erfolgte vom gleichen Blattmaterial. Hierfür wurde die Gesamt-DNA aus dem infizierten Blattmaterial extrahiert und für die Amplifikation von *ppi* (Pilzgen) und *GAPDH* (Pflanzengen) verwendet. SG200 wurde auch hier als Referenz verwendet und deshalb gleich 1 gesetzt. Die Graphen zeigen das Verhältnis von relativer Expression der Autophagiegene zur relativen Pilzbiomasse. Die Mittelwerte aus zwei biologischen Replikaten wurden \pm Standardabweichung dargestellt. Die Auswertung ergab für alle getesteten Gene eine erhöhte Expression in SG200 $\Delta tin3$ -infizierten Blättern.

2.9.3 In SG200 $\Delta tin3$ infizierten Pflanzen wird eine Akkumulation von Autophagosomen beobachtet

Im nächsten Schritt sollte die Inhibition der Autophagosomenbildung im natürlichen *U. maydis* – *Z. mays* Pathosystem gezeigt werden. Sieben Tage alte Maispflanzen wurden hierfür mit SG200 bzw. SG200 $\Delta tin3$ infiziert und 30 Stunden nach Infektion durch unterschiedliche Färbungen auf die Bildung von Autophagosomen untersucht. Monodansylcadaverin (MDC) ist eine autofluoreszierende Substanz, die verwendet wurde, um Autophagie in Pflanzen zu detektieren (Biederbick *et al.*, 1995). Dabei kann MDC als schwache Base die biologischen Membranen passieren und sich in sauren Kompartimenten wie Autophagosomen oder Endosomen anreichern. Zusätzlich wurden in einigen Fällen die Membranen infizierter Pflanzenzellen mit dem Farbstoff FM4-64 gefärbt. Pilzhyphen

wurden durch die Färbung mit WGA-AF488 (wheat germ agglutinin) sichtbar gemacht. Die gleichzeitige Färbung mit allen Farbstoffen erfolgte durch Vakuuminfiltration von SG200- und SG200 $\Delta tin3$ -infizierten Blattbereichen. Anschließend wurden die gefärbten Präparate durch konfokale Laserscanning Mikroskopie analysiert und durch Überlagerung von mehreren Ebenen und Farbkanälen dreidimensional dargestellt. Konfokale Mikroskopieaufnahmen zeigen, dass sich im gesamten Cytoplasma der SG200 $\Delta tin3$ -infizierten Blätter gefärbte Autophagosomen anreichern, während in SG200-infizierten Blättern keine Anreicherung zu beobachten ist (Abb. 33 A). Die Quantifizierung ergab in Infektionen mit dem Wildtypstamm SG200 in 7 % der Zellen Autophagosomen, während in der *tin3* Deletionsmutante diese Zahl signifikant auf 72 % gesteigert wurde (Abb. 33 B). Die MDC-Färbung von Autophagosomen konnte auch *in vivo* eindeutig den Einfluss von Tin3 auf die Bildung von Autophagosomen zeigen und somit die vorherigen Ergebnisse bestätigen.

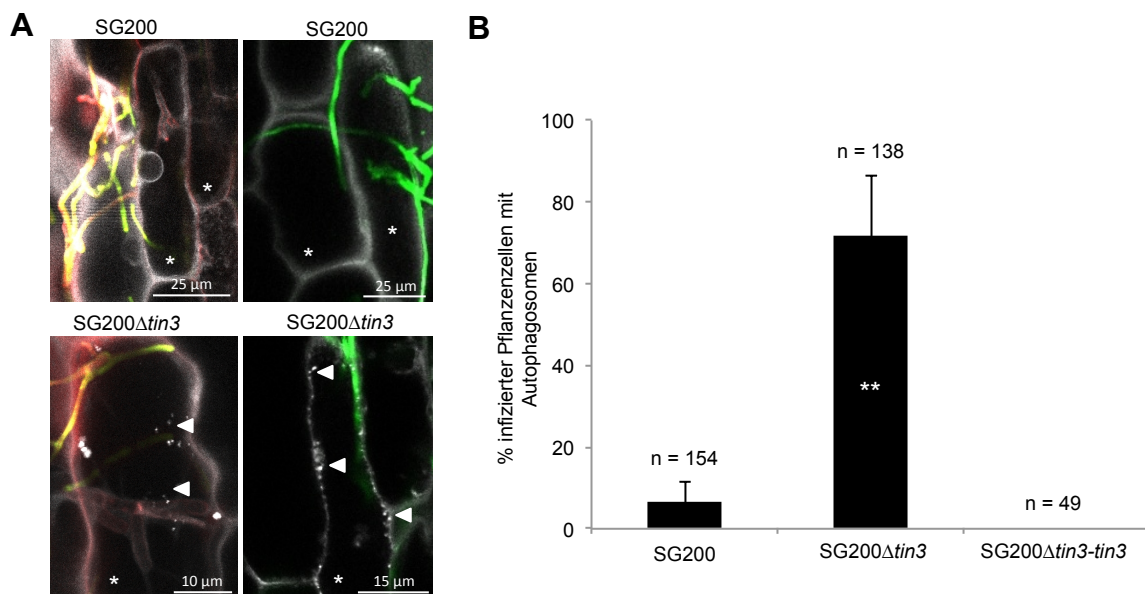


Abb. 33: **MDC-Färbung zur Detektion von Autophagosomen im Maisgewebe 30h nach SG200 bzw. SG200 $\Delta tin3$ Infektion.** **A** Autophagosomen in infiziertem Pflanzengewebe wurden mit MDC gefärbt (weiß). Die verschiedenen Pilzstrukturen auf der Pflanzenoberfläche sowie innerhalb des Pflanzengewebes wurden mittels WGA-AF488 angefärbt (grün). Membranen infizierter Pflanzenzellen wurden in den beiden linken Abbildungen mit dem Farbstoff FM4-64 visualisiert (rot). Sterne markieren infizierte Zellen, Pfeile zeigen die Akkumulation von Autophagosomen. Die konfokale Laserscanning Mikroskopie zeigte eine deutliche Akkumulation von Autophagosomen in SG200 $\Delta tin3$ infizierten Pflanzenzellen, aber nicht in SG200. **B** Quantitative Auswertung von Autophagosomenbildung in infizierten Pflanzen. Anzahl der infizierten Zellen mit Autophagosomen wurde als prozentualer Anteil zur Gesamtzahl der infizierten Zellen (n) dargestellt. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte aus drei biologischen Replikaten, die \pm Standardabweichung dargestellt wurden. ** < 0,005 signifikante Unterschiede zum Wildtyp SG200.

2.10 Infektionen mit SG200 $\Delta tin3$ zeigen deutliche H₂O₂-Akkumulationen

Pflanzen besitzen ein vielseitiges Abwehrsystem welches durch Pathogene wie *U. maydis* induziert werden kann. Zu diesen Abwehrmechanismen gehört auch die verstärkte Produktion von reaktiven Wasserstoffspezies (ROS) wie H₂O₂ sowie der damit verbundene lokale Zelltod der Pflanzenzellen. Die Akkumulation von H₂O₂ in infizierten Maisblättern wurde, durch die Färbung mit Diaminobenzidin (DAB), sichtbar gemacht (Thordal-Christensen *et al.*, 1997; Fryer *et al.*, 2002). DAB ist eine organische Substanz, die durch H₂O₂ oxidiert werden kann und dann ein braunes Präzipitat bildet. Gefärbt wurden SG200 und SG200 $\Delta tin3$ infizierte Blätter 30 Stunden nach Infektion.

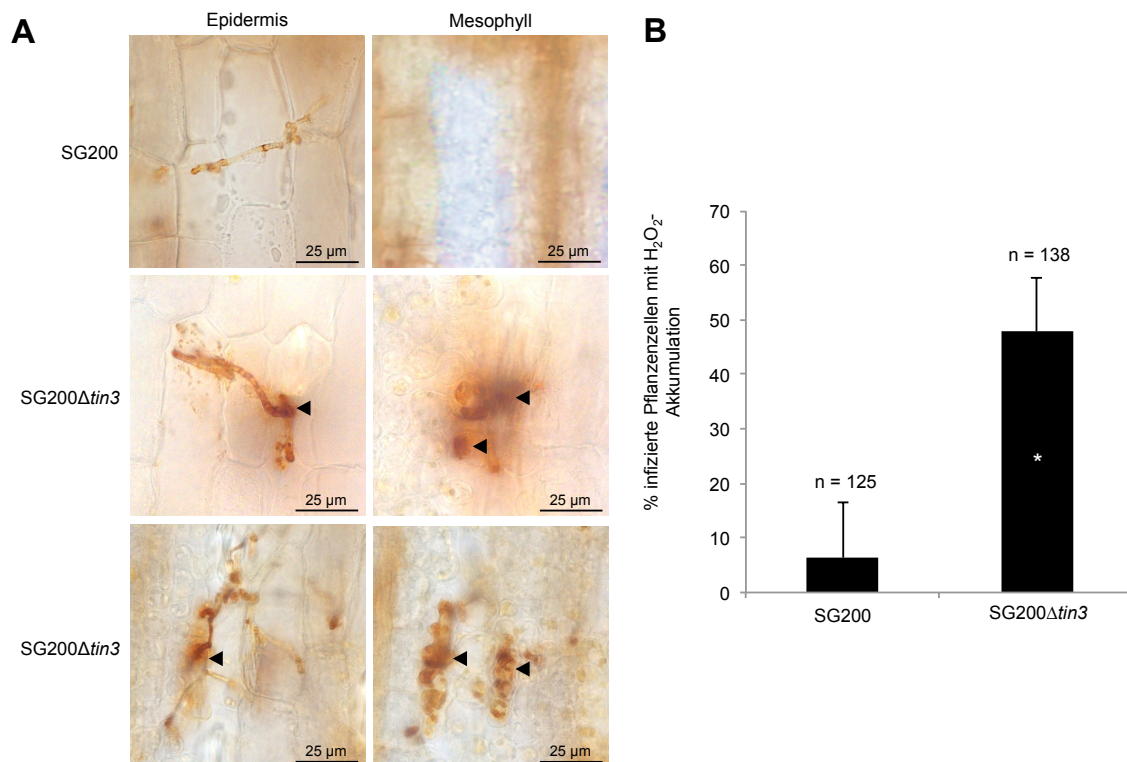


Abb. 34: **DAB-Färbung von infizierten Maisblättern zur Identifizierung von H₂O₂-Akkumulationen.** **A** Bilder zeigen SG200 und SG200 $\Delta tin3$ infizierte Maisblätter 30 Stunden nach Infektion. Die Akkumulation von H₂O₂ wurde durch die Färbung mit DAB untersucht. Gezeigt sind Zellen der Epidermisschicht sowie des Mesophylls im gleichen Bildausschnitt; Pfeile zeigen die braunen Ablagerungen, die durch die Oxidation von DAB durch H₂O₂ entstehen. Durch konfokale Mikroskopie konnte gezeigt werden, dass Pflanzenzellen nach Infektion mit der *tin3* Deletionsmutante verstärkt H₂O₂ akkumulieren. **B** Gezeigt ist die Auswertung der DAB-Färbung von infizierten Maisblättern. Hierbei wurde die Anzahl der infizierten Zellen die H₂O₂-Akkumulationen zeigen als prozentualer Anteil zur Gesamtzahl der infizierten Zellen (n) dargestellt. Eindeutig zeigte sich der signifikante Unterschied zwischen SG200 und SG200 $\Delta tin3$. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte aus drei biologischen Replikaten, die \pm Standardabweichung dargestellt wurden. * < 0,05 signifikante Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp SG200.

Hierbei konnten in SG200 selten Ablagerungen identifiziert werden, was darauf schließen lässt, dass die Abwehr der Pflanze unterdrückt und kein H_2O_2 gebildet wurde (Abb. 34 A). Im Gegensatz hierzu wurde in Infektionen der *tin3* Deletionsmutante im Bereich der Pilzhypen und vor allem im darunter liegenden Mesophyll ein deutliches braunes Präzipitat beobachtet. Die statistische Auswertung ergab in SG200 infiziertem Gewebe eine H_2O_2 -Akkumulation in etwa 6 % der infizierten Zellen bzw. dem darunter liegenden Mesophyll; in SG200 $\Delta tin3$ Infektionen konnte dies signifikant auf 48 % gesteigert werden (Abb. 34 B).

2.11 Tin3 Prozessierung

Die möglichen zwei Funktionen von Tin3 im Apoplasten und in Pflanzenzellen könnten nach Prozessierung von Tin3 durch separate Domänen erfolgen. Aus diesem Grund sollte untersucht werden, ob Tin3 prozessiert wird und möglicherweise nur der konservierte Bereich von Tin3 in die Pflanze aufgenommen wird oder Aufnahme des Volllängen-Proteins erfolgt. Für diesen Zweck wurden Extrakte von SG200 $\Delta tin3$ -*tin3*¹⁻²¹-HA-*tin3*²²⁻²⁶⁵-HA- und SG200 $\Delta tin3$ -*tin3*¹⁻⁹⁹-HA-*tin3*¹⁰⁰⁻²⁶⁵-HA-infizierten Maisblätter zwei Tage nach Infektion verwendet, um Immunopräzipitationen der HA-Fusionsproteine durchzuführen. Als Negativ-Kontrolle wurden SG200-infizierte Maisblätter verwendet, um unspezifisch gebundene Proteine zu detektieren. Positiv-Kontrolle war ein im Pierce HA-Tag IP/Co-IP Kit (Pierce/Thermo Scientific, Bonn) mitgeliefertes HA-Fusionsprotein. Die Western-Blot Analyse zeigte zwei sehr starke Banden in allen Proben, die unspezifische Banden darstellen, da sie auch in Lysaten von SG200 zu sehen waren (Abb. 35). *Tin3*¹⁻²¹-HA-*Tin3*²²⁻²⁶⁵-HA und *Tin3*¹⁻⁹⁹-HA-*Tin3*¹⁰⁰⁻²⁶⁵-HA (32 kD) konnten beide in sehr geringen Mengen als Volllängen-Proteine detektiert werden (Abb. 35).

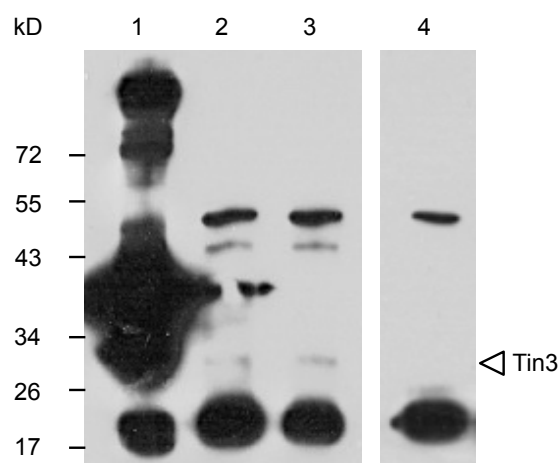


Abb. 35: **HA-Immunopräzipitation von Tin3 Fusionsproteinen aus infiziertem Pflanzengewebe.** Maispflanzen wurden mit SG200, SG200 Δ tin3-tin3¹⁻²¹-HA-tin3²²⁻²⁶⁵-HA und SG200 Δ tin3-tin3¹⁻⁹⁹-HA-tin3¹⁰⁰⁻²⁶⁵-HA infiziert und nach zwei Tagen geerntet. Proteinlysate der infizierten Blätter wurden anschließend für die Immunopräzipitation verwendet (1) Kontroll-Protein (Pierce/Thermo Scientific, Bonn) (2) Lysat von SG200 Δ tin3-tin3¹⁻²¹-HA-tin3²²⁻²⁶⁵-HA Infektionen (3) Lysat von SG200 Δ tin3-tin3¹⁻⁹⁹-HA-tin3¹⁰⁰⁻²⁶⁵-HA Infektionen (4) Lysat von SG200 Infektionen. Die Detektion der Fusionsproteine erfolgte durch anti-HA Antikörper. Hierbei konnten Tin3¹⁻²¹-HA-Tin3²²⁻²⁶⁵-HA und Tin3¹⁻⁹⁹-HA-Tin3¹⁰⁰⁻²⁶⁵-HA (32 kD) sehr schwach nachgewiesen werden. Pfeilspitzen geben die Größe der Fusionsproteine an, der Größenstandard ist links angegeben.

In einem weiteren Experiment wurde gereinigtes Tin3 Protein entweder mit dem Pflanzenlysat von infizierten Maispflanzen (Abb. 36 A) oder mit Apoplastenflüssigkeit von Salicylsäure-infiltrierten Maisblättern (Abb. 36 B) inkubiert. In einer Zeitreihe über 60 Minuten konnte kein Abbau des Tin3 Proteins beobachtet werden. Beide Ergebnisse lassen vermuten, dass keine Prozessierung von Tin3 im Apoplasten stattfindet.

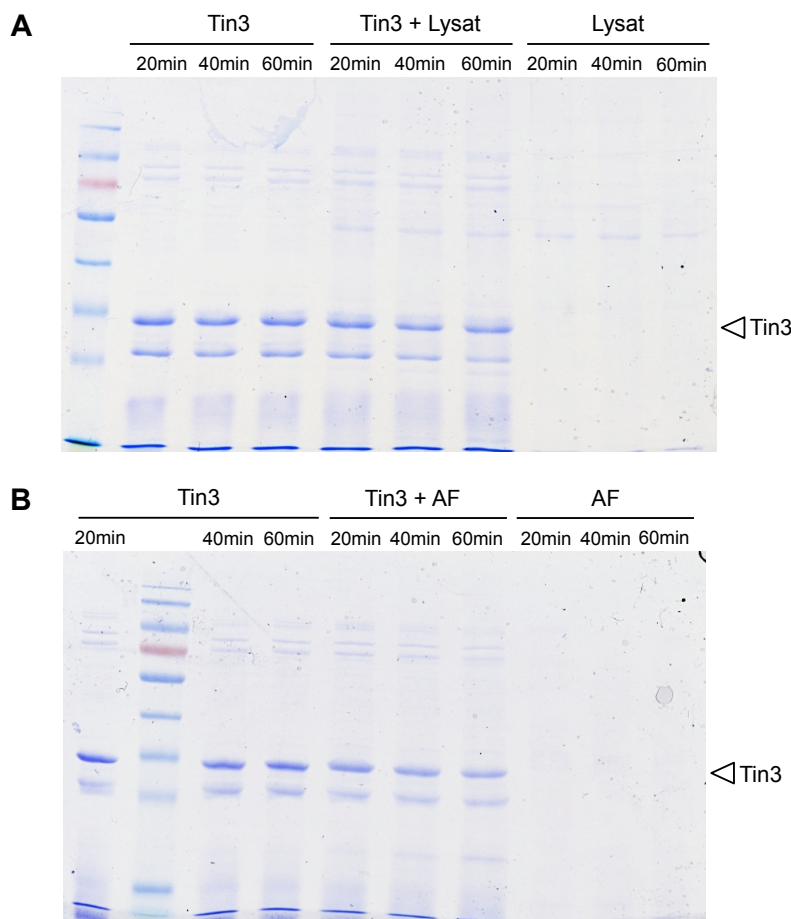


Abb. 36: **Tin3 Prozessierung nach Inkubation mit Pflanzenlysat von SG200-infizierten Maisblättern bzw. mit Apoplastenflüssigkeit von Salicylsäure-infiltrierten Maisblättern.** Zur Kontrolle wurden aufgereinigtes Tin3 Protein (Tin3; 1 mg/ml), Pflanzenlysat von SG200-infizierten Maisblättern (**A**; Lysat, 1 mg/ml) und Apoplastenflüssigkeit von Salicylsäure-infiltrierten Maisblättern (**B**; AF, 1 mg/ml) mit Puffer inkubiert. Die Prozessierung wurde durch Inkubation mit Pflanzenlysat von SG200-infizierten Maisblättern (**A**; Tin3 + Lysat) oder mit Apoplastenflüssigkeit von Salicylsäure-infiltrierten Maisblättern (**B**; Tin3 + AF) untersucht. Nach jeweils 20, 40 und 60 min wurden Proben entnommen und mittels SDS-PAGE untersucht. Pfeile zeigen das Vollängen-Tin3 Protein.

3 Diskussion

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der funktionellen Charakterisierung des Tin3 Effektorproteins, welches für die Virulenz von *U. maydis* benötigt wird und dabei vor allem für die Produktion der tumorartigen Wucherungen verantwortlich ist. Der Virulenzdefekt der *tin3* Mutante konnte hierbei auf eine duale Funktion von Tin3 während der biotrophen Entwicklungsphase zurückgeführt werden. Tin3 ist an der Unterdrückung pflanzlicher Abwehrreaktionen beteiligt und trägt hierüber zur an der Etablierung der Biotrophie zwischen Pilz und Pflanze beteiligt bei.

Die Schwerpunkte der Diskussion liegen zunächst auf einer phänotypischen Betrachtung der *tin3* Deletionsmutante, gefolgt von der funktionellen Charakterisierung des Tin3 Effektorproteins, wobei die Funktionen als Proteaseinhibitor und Autophagieinhibitor näher diskutiert werden. Zuletzt wird auf die Rolle von Tin3 bei der Unterdrückung von pflanzlichen Abwehrmechanismen eingegangen.

3.1 Tin3 wird während der biotrophen Entwicklung von *U. maydis* induziert und sekretiert

Die Expressionsanalyse von *tin3* mittels qPCR zeigt eine spezifische und sehr starke Induktion während der biotrophen Wachstumsphase von *U. maydis* und bestätigt somit zuvor beobachtete Resultate (vgl. Abb. 8; Thomas Brefort, pers. Mitteilung; Kämper *et al.*, 2006). Des Weiteren konnte anhand von Wachstumsversuchen in axenischer Kultur kein Einfluss von Tin3 auf Prozesse in der saprophytischen Phase, bei der Filamentbildung oder unter Stressbedingungen festgestellt werden, was ebenfalls die Expressionsdaten stützt und für eine Rolle von Tin3 ausschließlich in der pathogenen Entwicklung von *U. maydis* spricht.

Durch bioinformatische Analysen konnte für Tin3 ein Sekretionssignal identifiziert werden (vgl. Abb. 7), was auf einen Transport des Effektors über den klassischen Sekretionsweg durch Exocytose bis in den apoplastischen Bereich hinweist. Diese Beobachtung konnte durch mikroskopische Analysen infizierten Gewebes mit einem *U. maydis* Stamm, der ein Tin3-GFP Fusionsprotein exprimiert, gestützt werden (Thomas Brefort, pers. Mitteilung). Hierbei zeigt das Tin3-GFP Fusionsprotein eine Akkumulation in Zell/Zell-Passagen und in Hyphenspitzen, Bereiche in denen normalerweise Proteine sekretiert werden (Bauer *et*

al., 1997). Darüber hinaus konnte ein die Pilzhyphe umgebendes Signal beobachtet werden, was auf eine Anreicherung im apoplastischen Spalt hindeutet und damit auch die Sekretion von Tin3 voraussetzt (Thomas Brefort, pers. Mitteilung). Eine solche Lokalisierung konnte bereits für das sekretierte *U. maydis* Protein Pep1 gezeigt werden (Doehlemann *et al.*, 2009). Eine Aufnahme des Tin3-GFP Fusionsproteins in Pflanzenzellen konnte aufgrund starker Autofluoreszenz des Pflanzengewebes nicht beobachtet werden. Des Weiteren sind nach Import in Pflanzenzellen schwache Fluoreszenzsignale zu erwarten, die durch diese Methode nicht detektierbar sind. Eine Western-Blot Analyse von Kulturüberständen artifiziell-induzierter Filamente verifizierte die Sekretion des Volllängen Tin3-HA Fusionsproteins und damit die Funktionalität des Signalpeptids (vgl. Abb. 9). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Tin3 während der biotrophen Entwicklung transkriptionell induziert und anschließend in den pflanzlichen Apoplasten sekretiert wird.

3.2 Tin3 ist für die Virulenz von *U. maydis* notwendig

Pflanzeninfektionen der *tin3* Deletionsmutante demonstrieren eine stark verminderte Virulenz im Vergleich zum solopathogenen Ausgangsstamm SG200. Vor allem in Bezug auf die Tumorbildung konnte für Tin3 eine essenzielle Rolle gezeigt werden, die durch eine signifikante Reduktion nach Infektion mit der *tin3* Mutante deutlich wird. Die Re-Integration von *tin3* konnte dabei den Phänotyp vollständig komplementieren und damit den Defekt der Mutante eindeutig der Funktion des Tin3 Effektorproteins zuweisen (Thomas Brefort, pers. Mitteilung; vgl. Abb. 11). Insgesamt zeigen Effektor-Deletionsmutanten in *U. maydis* sehr unterschiedliche Ausprägungen der Virulenz. Essenzielle Proteine wie zum Beispiel Stp1 oder Pep1 sind nach Deletion des entsprechenden Gens apathogen und können keine biotrophe Interaktion etablieren (K. Schipper, pers. Mitteilung; Doehlemann *et al.*, 2009). Andere Effektormutanten, wie beispielsweise die sekretierte Corismatmutase Cmu1 zeigen lediglich eine Reduktion der Virulenz und haben dennoch bedeutende Funktionen für die Interaktion mit der Wirtspflanze Mais (Djamei *et al.*, 2011). Mikroskopische Analysen von SG200 $\Delta tin3$ -infizierten und SG200-infizierten Blättern konnten in verschiedenen Infektionsstadien keine Unterschiede aufzeigen. Erst durch die Bestimmung der relativen Pilzbiomasse mittels qPCR konnte in späteren Stadien für die *tin3* Mutante ein Proliferationsdefekt nachgewiesen werden, der mit dem Fehlen von großen tumorösen Bereichen in der

Mutante einhergeht (vgl. Abb. 12). Gerade auch zu diesem Zeitpunkt ist die *tin3* Expression besonders stark und weist damit auf die Notwendigkeit von Tin3 während dieser Phase hin.

Insgesamt identifizieren die Ergebnisse Tin3 als Virulenzfaktor von *U. maydis*, der während der biotrophen Entwicklung benötigt wird und hierbei vor allem für die Tumorbildung verantwortlich ist. Interessanterweise zeigen Mikroarray-Analysen von Infektionen der Clustermutante 19A sowie der *tin3* Mutante im Vergleich zu SG200 eine spezifische Induktion von pflanzlichen Abwehrgenen, wie z. B. Cysteinproteasen oder Transkriptionsfaktoren (Thomas Brefort, pers. Mitteilung). Es ist somit davon auszugehen, dass der Virulenzdefekt der *tin3* Mutante auf eine Erkennung des Pilzes durch die Pflanze und damit verbundene Abwehrmechanismen zurückzuführen ist. Begründet durch diese Ergebnisse kann für Tin3 also eine Funktion in der Unterdrückung des pflanzlichen Immunsystems vermutet werden.

In diesem Zusammenhang konnten bioinformatische Analysen von Tin3 weder homologe Proteine noch funktionelle Domänen identifizieren, die eine Vermutung über die Funktion des Effektorproteins zulassen. Auch der Vergleich von Tin3 Orthologen aus *U. maydis* verwandten Pilzen zeigt nur eine schwache Gesamtkonserviertheit der Proteine und liefert keine funktionellen Hinweise (vgl. Abb. 7). In einer Hefe Zwei-Hybrid-Analyse wurden die Maisproteine Mir3 und Beclin1 neben Arf1 und Suf4 als Interaktionspartner von Tin3 isoliert (Thomas Brefort, pers. Mitteilung). Mir3 und Beclin1 konnten auch als Volllängen-Proteine mit Tin3 interagieren (vgl. Abb. 13). Im Folgenden wird die Interaktion von Tin3 mit der sekretierten Mais-Cysteinprotease Mir3 und dem intrazellulären Autophagie-Protein Beclin1 diskutiert.

3.3 Tin3 inhibiert die pflanzlichen Cysteinproteasen Mir3 und CP1A *in vitro*

Pflanzliche Cysteinproteasen spielen eine entscheidende Rolle in der Abwehr von Phytopathogenen. So konnte zum Beispiel für Papain in Papayablättern und Mir1 in Maisblättern die direkte Abwehr von Insektenlarven gezeigt werden (Pechan *et al.*, 2000; Konno *et al.*, 2003). Die funktionelle Beziehung zwischen Tin3 und der Mais-Protease Mir3 konnte in einem *in vitro* Protease-Aktivitätstest gezeigt werden, in dem die heterolog exprimierten und gereinigten Proteine verwendet wurden. Hierbei stellte sich Tin3 als effektiver Inhibitor von Mir3 heraus (vgl. Abb. 17). Des Weiteren konnten zwei aktive

Varianten von Mir3 generiert werden, die sich in der Anwesenheit der C-terminalen Granulin-Domäne unterscheiden. Auch die verkürzte Mir3 Version kann signifikant von Tin3 inhibiert werden. Ob diese verkürzte Form durch Prozessierung *in vivo* entsteht, wurde allerdings nicht untersucht. Das Vorhandensein von zwei aktiven Proteaseformen wurde jedoch für die Mir3-verwandte Tomaten-Protease C14 und deren Ortholog RD21 in *Arabidopsis* gezeigt (Yamada *et al.*, 2001; Kaschani *et al.*, 2010). Für C14 konnte durch „Silencing“ eine Rolle bei der Abwehr von Pathogenen gezeigt werden und auch in diesem Fall ist die Protease das Ziel von Effektorproteinen, wie zum Beispiel EPIC1 von *P. infestans* (Kaschani *et al.*, 2010). Bei der Untersuchung des *U. maydis* – Mais Pathosystems wurden im Maisapoplasten 5 Cysteinproteasen identifiziert, die durch Salicylsäure-Signalwege weiter induziert werden können (van der Linde *et al.*, 2012). Eine dieser Proteasen ist CP1A, die in Sequenzanalysen 92 % Identität zu Mir3 aufweist. Hefe Zwei-Hybrid-Analysen bestätigen die direkte Interaktion von Tin3 und CP1A, die ferner auch durch *in vitro* Protease-Aktivitätstests gestützt wird, in denen Tin3 die Protease erfolgreich inhibieren kann (vgl. Abb. 19). Es wird also deutlich, dass Tin3 in der Lage ist, unterschiedliche Proteasen zu inhibieren. Eine solche Funktion konnte bereits für den *C. fulvum* Effektor Avr2 beschrieben werden. Hierbei wurde gezeigt, dass Avr2 multiple extrazelluläre Cysteinproteasen von Tomaten, wie zum Beispiel Rcr3 und Pip1 inhibieren kann (van Esse *et al.*, 2008). „Silencing“ von Avr2 hatte dabei eine Reduktion der *C. fulvum* Virulenz auf Tomaten zur Folge. Es kann daher für Tin3 vermutet werden, dass die inhibierten Proteasen für die Pflanzenabwehr benötigt werden und deshalb Ziel des Effektorproteins sind.

3.4 Tin3 ist wichtig für die Inhibition von Abwehr-induzierten apoplastischen Cysteinproteasen in Mais

Auch *in vivo* konnten die Auswirkungen der Inhibitor-Funktion von Tin3 weiter charakterisiert werden, wobei die Proteaseaktivität in Blattlysaten von infizierten Maispflanzen teilweise durch rekombinantes Tin3 inhibiert wird (vgl. Abb. 22). Die verbleibende Proteaseaktivität der Blattlysate nach Inkubation mit Tin3 lässt sich dabei entweder auf einen Überschuss an aktiven Proteasen zurückführen oder auf eine Spezifität der Tin3 Inhibition, d. h. selektive Inhibition einzelner Proteasen. Insgesamt wird durch dieses Experiment die Vermutung bestärkt, dass Tin3 multiple Proteasen inhibieren kann. Bemerkenswerterweise konnte die Aktivität in Blattlysaten aus SG200-infizierten Pflanzen

weniger inhibiert werden, als in Blattlysaten aus SG200 Δ *tin3*-infizierten Pflanzen. Dies verdeutlicht, dass der Effekt des natürlich sekretierten Tin3 Effektorproteins bereits in Blattlysaten infizierter Pflanzen sichtbar wird. Interessant wäre den Effekt von Tin3 auf die Aktivität von Proteasen in apoplastischer Flüssigkeit von SG200- und SG200 Δ *tin3*-infizierten Blättern zu untersuchen, da der beobachtete Effekt durch die hohe Abundanz der Cysteinproteasen im Apoplasten noch deutlicher werden sollte.

Die Bedeutung von Tin3 für die Inhibition der apoplastischen, abwehrinduzierten Cysteinproteasen konnte auch durch die Inhibition von apoplastischer Flüssigkeit SA-infiltrierter Maisblätter gezeigt werden. Diese Funktion ist von besonderer Bedeutung, da durch die Invagination der Plasmamembran die Pilzhyphen zuerst mit dem pflanzlichen Apoplasten in Kontakt treten und Effektorproteine wie Tin3 in diese Interaktionszone sekretiert werden. Im Durchschnitt konnte die Proteaseaktivität durch Tin3 bis auf 27 % gesenkt werden, wobei einige Fraktionen vollständig inhibiert werden konnten (vgl. Abb. 24). Diese Ergebnisse deuten des Weiteren auf eine mögliche Spezifität von Tin3 hin, da nicht alle Fraktionen gleichermaßen blockiert werden. Zusätzlich kann vermutet werden, dass weitere Proteaseinhibitoren von *U. maydis* an dieser initialen Unterdrückung von aktiven Cysteinproteasen beteiligt sind, um eine vollständige Inhibition zu gewährleisten. In diesem Zusammenhang wurde bereits für den *U. maydis* Effektor Pit2 eine Proteaseinhibitor-Funktion gezeigt (Müller *et al.*, 2013). Pit2 inhibiert apoplastische Cysteinproteasen, wobei diese Inhibition auf ein kurzes Peptid des Effektorproteins zurückzuführen ist (Müller *et al.*, 2013). Vergleicht man die Inhibitionsmuster von Proteasen in Apoplastenflüssigkeit der beiden *U. maydis* Inhibitoren Tin3 und Pit2, wird deutlich, dass deren Spezifität voneinander abweicht (Müller *et al.*, 2013). Auch für *P. infestans* konnte bereits die Sekretion von mehreren Proteaseinhibitoren, z. B. EPIC1 und EPIC2, gezeigt werden, die zum Teil die gleichen Zielproteasen inhibieren, aber auch Unterschiede in ihrer Spezifität aufzeigen (Tian *et al.*, 2007).

3.5 Tin3 inhibiert Cysteinproteasen der C1A Familie durch die Bindung an das aktive Zentrum

Die Aufklärung des Wirkmechanismus von Tin3 erfolgte durch die Ermittlung der Interaktionsstelle der beiden Proteine. Eine Möglichkeit der Proteaseinhibition ist die Blockierung des aktiven Zentrums. Aus diesem Grund wurde eine mutierte Version von Mir3 für eine Hefe Zwei-Hybrid-Analyse verwendet, in der Cystein und Histidin des

aktiven Zentrums mutiert wurden. Diese katalytisch inaktive Form von Mir3 ist nicht in der Lage, mit dem Effektor Tin3 zu interagieren. Daraus leitet sich für den Wirkmechanismus von Tin3 eine Bindung an das aktive Zentrum der Protease und eine damit verbundene Blockierung der Aktivität ab (vgl. Abb. 25). Im Vergleich zu Pit2 kennzeichnet sich die Tin3 Inhibition durch eine höhere Effektivität in *in vitro* Protease-Aktivitätstests, da schon geringe Mengen des Tin3 Effektors ausreichen, um Proteasen zu inhibieren. Diese Beobachtung könnte auf die unterschiedliche Art der Inhibition der beiden Effektorproteine zurückzuführen sein. Pit2 bindet nicht in das aktive Zentrum der Protease und weist damit einen zu Tin3 unterschiedlichen Wirkmechanismus auf (Müller *et al.*, 2013). Vorläufige enzymkinetische Messungen der Tin3 Inhibitor-Funktion deuten darauf hin, dass es sich um eine kompetitive Hemmung handelt, bei der der Inhibitor mit dem Substrat um die Bindestelle im aktiven Zentrum konkurriert (Daten nicht gezeigt). Durch die Inkubation der aufgereinigten und aktivierten Protease Mir3 mit dem gereinigten Tin3 Effektorprotein konnte Tin3 als Substrat von Mir3 ausgeschlossen werden, da keine proteolytischen Spaltprodukte beobachtet wurden (vgl. Abb. 18). Die aus vorherigen Protease-Aktivitätstests von apoplastischen Proteasen vermutete Spezifität der Tin3 Inhibitor-Funktion wurde durch Interaktionsstudien weiter untersucht. Tin3 konnte mit allen Cysteinproteasen, die im apoplastischen Bereich von Maisblättern detektiert wurden (van der Linde *et al.*, 2012) interagieren (vgl. Abb. 21). Dieses Ergebnis war erwartet, da diese Proteasen alle das gleiche konservierte aktive Zentrum aufweisen, welches für die Interaktion mit Tin3 verantwortlich ist. Die beobachteten deutlichen Unterschiede in der Stärke der Interaktion sind möglicherweise auf eine unterschiedlich starke Expression der Proteasen zurückzuführen, was in einer Western-Blot Analyse geklärt werden sollte. Sollte diese Analyse eine vergleichbare Expression zeigen, würde dies eine Spezifität von Tin3 untermauern. Eine Spezifität der Interaktion würde direkt mit dem Verwandtschaftsgrad zu Mir3 und dem Vorhandensein der C-terminalen Extension korrelieren. Die Proteasen 66281, CP1A und CP1B mit starker Tin3-Interaktion zeigen eine hohe Identität zu Mir3 und besitzen eine C-terminale Verlängerung mit einem Prolin-reichen Bereich und einer Granulin-Domäne.

Welcher Bereich von Tin3 für die Inhibition von Cysteinproteasen verantwortlich ist konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden. In einer Komplementationsstudie mit verkürzten Tin3 Derivaten konnte gezeigt werden, dass der konservierte Bereich im N-Terminus von Tin3 die *tin3* Deletionsmutante teilweise komplementieren kann. Allerdings konnte für diesen Bereich in *in vitro* Aktivitätstests keine Protease Inhibition gezeigt

werden (vgl. Abb. 27). Aus diesem Grund wird für diesen Bereich eine zweite Funktion postuliert, die im nächsten Abschnitt näher beschrieben wird. Weiterhin konnte auch der C-Terminus von Tin3 eine partielle Komplementation der *tin3* Mutante bewirken, die auf eine Beteiligung an der Inhibitor-Funktion hinweisen könnte. Bisher konnte diese Vermutung nicht bestätigt werden, da es nicht möglich war, den C-Terminus von Tin3 heterolog herzustellen. Andererseits könnte aus sterischen Gründen auch das Vollängen-Tin3-Protein für die Inhibition benötigt werden. Für den *U. maydis* Effektor Pit2 konnte ein aus 14 Aminosäuren bestehendes Inhibormotiv identifiziert werden, das alleine für eine Proteaseinhibition ausreicht und für die Virulenz von *U. maydis* benötigt wird (Müller *et al.*, 2013). In Tin3 liegt dieses Motiv nicht vor. Dies unterstreicht nochmals das Vorliegen von unterschiedlichen Wirkmechanismen von Pit2 und Tin3. Die Strukturaufklärung des Protease-Inhibitor-Komplexes könnte langfristig Klarheit über die genaue Interaktion und den Wirkmechanismus schaffen.

3.6 Die Virulenz von *U. maydis* ist abhängig von der Proteaseinhibitor-Funktion von Tin3

Die biologische Relevanz der Tin3 Inhibitorfunktion konnte durch die Komplementation der *tin3* Mutante mit bekannten Proteaseinhibitoren veranschaulicht werden. Der *P. infestans* Effektor EPIC1 ist ein cystatin-ähnlicher Proteaseinhibitor, der mit der Mir3/CP1A-verwandten Protease C14 sowie Rcr3 interagiert und diese auch inhibieren kann (Song *et al.*, 2009; Kaschani *et al.*, 2010). EPIC1 besitzt alle aktiven, konservierten Cystatin-Domänen und ist in der Lage, mehrere extrazelluläre Cysteinproteasen von Tomaten zu inhibieren (Tian *et al.*, 2007). EPIC1 konnte den Phänotyp der *tin3* Deletionsmutante ansatzweise komplementieren, allerdings ließ sich dies statistisch nicht absichern (vgl. Abb. 28). Da der Wirkmechanismus von EPIC1 als cystatin-ähnliches Protein von Tin3 abweicht und dieser Effektor aus einem anderen Pathosystem stammt, war es nicht überraschend, dass die Komplementation nicht eindeutig war. Aus diesem Grund wurde auch der bereits bekannte Cysteinprotease-Inhibitor Pit2 von *U. maydis* für die Komplementation verwendet. Dieser besitzt einen von Tin3 abweichenden Wirkmechanismus, interagiert aber mit den gleichen Cysteinproteasen im Maisapoplasten wie Tin3 (Müller *et al.*, 2013). Pit2 konnte die *tin3* Mutante in Bezug auf Virulenz partiell komplementieren. Infizierte Pflanzen zeigten signifikant weniger kleine Tumore und signifikant mehr große Tumore, wodurch die biologische Relevanz der Proteaseinhibitor-

Funktion von Tin3 bestätigt werden konnte (vgl. Abb. 29). Die nicht vollständige Komplementation, lässt sich vermutlich durch die duale Funktionalität des Tin3 Effektors erklären. Des Weiteren bezeugt diese Komplementation eine gewisse funktionelle Redundanz zwischen Tin3 und Pit2. Denkbar ist, dass in einer normalen Infektion beide Effektoren zu unterschiedlichen Zeitpunkten der *U. maydis*-Mais Interaktion benötigt werden. So erreicht Tin3 in frühen (2 dpi) und späten Stadien (10 dpi und 12 dpi) der biotrophen Entwicklung Expressionspeaks, was auf eine bedeutende Funktion in diesen Phasen hindeutet, Pit2 wird nach 2 dpi induziert und bleibt bis 8 dpi aktiv (Müller *et al.*, 2013). Die Entwicklung von Proteinen mit gleicher Funktion wird hierbei generell durch das Wettrüsten zwischen Pflanze und Pathogen begünstigt (Ma *et al.*, 2006).

3.7 Die konservierte Domäne von Tin3 vermittelt die Interaktion mit Autophagieprotein Beclin1

Durch Aminosäuresequenzanalysen mit Tin3 Orthologen aus verwandten Pilzen wurde ein Bereich mit höherer Identität im Vergleich zum Gesamtprotein identifiziert. Wie zuvor beschrieben konnte für die konservierte Domäne im N-Terminus von Tin3 eine teilweise Komplementation der *tin3* Deletionsmutante beobachtet werden. Diese funktionelle Komplementierung konnte allerdings nicht mit der gezeigten Proteaseinhibitor-Funktion von Tin3 in Beziehung gebracht werden und deutet deshalb auf eine weitere Funktion des Tin3 Effektors hin. Hefe Zwei-Hybrid-Analysen identifizierten das Autophagie-Protein Beclin1 als Interaktionspartner von Tin3 (Thomas Brefort, pers. Mitteilung). Interessanterweise konnten Interaktionsstudien mit verkürzten Tin3 Derivaten die Interaktion mit Beclin1 auf den konservierten Bereich im N-Terminus zurückführen und lassen deshalb vermuten, dass dieser Bereich eine zweite Funktion hat (vgl. Abb. 30).

Mais Beclin1 und dessen Homolog Atg6 aus *S. cerevisiae* zeigen eine Aminosäureidentität von nur 22 % und es war daher fraglich, ob das Maisprotein die Funktion des Hefeproteins übernehmen kann. In einem Komplementationstest der Hefe *atg6* Mutante konnte Mais Beclin1 komplementieren. Auch für andere Pflanzenproteine konnte durch Komplementationen der entsprechenden Hefemutanten die Konservierung des Autophagieprozesses in Pflanzen demonstriert werden (Mitou *et al.*, 2009). Des Weiteren konnte bei Co-Expression von Tin3 bzw. der konservierten Tin3-Domäne in der mit Beclin1 komplementierten *atg6* Hefe-Mutante eine deutliche Reduktion der Autophagosomenbildung beobachtet werden (vgl. Abb. 31). Dieser Versuch lässt einen

negativen Einfluss des *U. maydis* Effektors Tin3 auf die Bildung von Autophagosomen vermuten, der wahrscheinlich durch die Interaktion mit Beclin1 ausgelöst wird. Vor allem für Viren konnte bereits gezeigt werden, dass diese durch die Interaktion mit Beclin1 in Säugetierzellen Autophagie inhibieren können. Autophagie besitzt in diesem System eine essenzielle Rolle bei antiviralen Abwehrmechanismen des Wirtes, zum Beispiel durch die Limitierung der viralen Replikation oder dem aktiven Abbau von Virenproteinen (He *et al.*, 2010). Die Liste der Beclin1 interagierenden viralen Proteine ist lang und beinhaltet beispielsweise virale Bcl-2-ähnliche Proteine der γ -Herpesviren (Oberstein *et al.*, 2007) oder einen Pathogenitätsfaktor von HIV-1 (Kyei *et al.*, 2009). Auch in *Arabidopsis* konnte eine wichtige Rolle von Beclin1 für Autophagie gezeigt werden, da Beclin1-,Silencing' Pflanzen nach Infektion mit dem Tabak-Mosaik-Virus nicht in der Lage waren, Autophagie zu induzieren und deshalb eine Ausbreitung der Viren zur Folge hatte (Liu *et al.*, 2005). Die Inhibition von Beclin1 hat somit einen Autophagiedefekt zur Folge wie es auch für die Beclin1-Tin3 Interaktion beobachtet werden konnte.

Aufgrund stark unterschiedlicher Wachstumskurven der verwendeten Hefe-Stämme unter Stickstoff-limitierenden Bedingungen sollte das Experiment besonders kritisch betrachtet werden, da die Überexpression der integrierten Gene z. B. einen generellen Vorteil für diese Stämme zur Folge haben könnte und lediglich aus Gründen besserer Fitness eine verminderte Autophagosomenbildung zeigen. Mit diesem Hintergrund sollten Versuche im natürlichen System bevorzugt werden.

3.8 Tin3 inhibiert Autophagie *in vivo*

In SG200 $\Delta tin3$ -infizierten Blättern ist die Expression der untersuchten Autophagiegene *atg6/beclin1*, *atg8*, *atg9* und *atg12*, im Vergleich zu SG200-infizierten Blättern erhöht und gibt damit Hinweise auf den inhibitorischen Effekt von Tin3 auf Autophagie (vgl. Abb. 32). Im Rahmen der AtGenExpress Initiative (www.arabidopsis.org) wurden Mikroarray-Daten von *Arabidopsis* Pflanzen nach Behandlung mit *Pseudomonas*-Stämmen oder unterschiedlichen PAMPs veröffentlicht. Die Daten konnten für 13 Autophagiegene (40 % aller bekannten Autophagiegene) eine Induktion durch Pathogen- bzw. PAMP-Behandlung demonstrieren, wobei diese in *A. thaliana* 2 – 15x induziert wurden (Lenz, 2011). Unter diesen Genen waren auch die in dieser Arbeit untersuchten Gene. Die Induktion der Autophagiegene nach Pathogenbefall zeigt die Beteiligung von Autophagie an Abwehrprozessen der Pflanze. Im Falle von *U. maydis* als kompatibles, biotrophes

Pathogen scheinen diese erfolgreich durch Tin3 unterdrückt zu werden, während nach Deletion von *tin3* eine Induktion der Autophagiegene beobachtet werden konnte. Generell werden Autophagiegene in Reaktion auf Stress transkriptionell reguliert, wobei der genaue Mechanismus nicht bekannt ist (He *et al.*, 2009). In *Drosophila* induziert ein FoxO (Forkhead box transcription factor class O) Transkriptionsfaktor Autophagie und induziert dabei ein Set von Autophagiegengen wie z. B. *atg12* und *beclin1* (He *et al.*, 2009). In Pflanzen könnte die Induktion von Autophagie auf ähnliche Weise ablaufen.

Zusätzlich konnten mikroskopische Analysen nach MDC-Färbung nur bei Infektionen mit der *tin3* Deletionsmutante eine starke Bildung von Autophagosomen in infizierten Maiszellen feststellen (vgl. Abb. 33). Infektionen mit SG200 oder dem Komplementationsstamm SG200 $\Delta tin3$ -*tin3* zeigen nur ein basales Level an Autophagosomenbildung. Um bisherige Ergebnisse der *in vivo* Färbung mit MDC zu verifizieren, werden die Blattproben zur Zeit in einer Kooperation mit K. Bolte (Marburg) in elektronenmikroskopischen Analysen untersucht. Insgesamt konnten die *in vivo* Beobachtungen die Beteiligung von Tin3 an der Suppression von Autophagie-Prozessen wahrscheinlich machen. Ob der Effekt von Tin3 hierbei direkt oder indirekt ist sollte durch weitere Experimente geklärt werden. Ein Beispiel für eine direkte Inhibition von Autophagie durch Effektoren konnte bereits für den IcsB Effektor von *Shigella flexneri* gezeigt werden. Atg5 interagiert hierbei mit dem *Shigella* Oberflächenprotein VirG, wodurch der Abbau von VirG durch Autophagosomen eingeleitet wird. Das IcsB Effektorprotein kann mit dieser Interaktion interferieren und so die Erkennung und den anschließenden Abbau verhindern. IcsB Mutanten werden von Autophagosomen eingeschlossen und abgebaut (Ogawa *et al.*, 2005).

Da die Autophagie-Inhibition in *U. maydis* sehr wahrscheinlich durch die Interaktion von Tin3 mit dem intrazellulären Beclin1 ausgelöst wird, muss das Tin3 Effektorprotein in die Pflanzenzelle aufgenommen werden. Eventuell könnte sogar nur der konservierte Bereich von Tin3 aufgenommen werden, da dieser essenziell für die Interaktion mit Beclin1 ist. HA-Immunopräzipitationen von Tin3¹⁻²¹-HA-Tin3²²⁻²⁶⁵-HA und Tin3¹⁻⁹⁹-HA-Tin3¹⁰⁰⁻²⁶⁵-HA aus SG200 $\Delta tin3$ -*tin3*₁₋₂₁-HA-*tin3*₂₂₋₂₆₅-HA- und SG200 $\Delta tin3$ -*tin3*₁₋₉₉-HA-*tin3*₁₀₀₋₂₆₅-HA-infizierten Pflanzen konnten die Volllängen-Tin3-Proteine identifizieren (vgl. Abb. 35). Da aber die Menge an Volllängen-Tin3 sehr schwach ist und prozessierte Formen in diesem Western-Blot vermutlich nicht sichtbar wären, sollte dieser Versuch mit mehr Material wiederholt werden. Außerdem sollten die Proben zusätzlich auf einem Tricin-Gel aufgetrennt werden, um eine mögliche Prozessierung von Tin3 nachweisen zu können.

Allerdings konnte aufgereinigtes Tin3 Protein weder durch die Inkubation mit Pflanzenlysat von infizierten Maisblättern noch mit Apoplastenflüssigkeit von Salicylsäure-infiltrierten Maisblättern prozessiert werden (Abb. 36), was eher für die Aufnahme des Volllängen-Proteins spricht. Um die Frage der Translokation zu verfolgen, wurden zwei Tin3-Peptide, Tin3 Δ 1-21,55-265 und Tin3 Δ 1-54,100-265, synthetisiert und mit einem C-terminalen Fluorescein (FAM) Farbstoff gekoppelt. Für beide Peptide wurde Aufnahme in protoplastierte Maiszellen beobachtet und starke Fluoreszenz-Signale wurden im Cytoplasma und in vesikelartigen Strukturen nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Die Tatsache, dass beide Peptide gleichermaßen aufgenommen werden demonstriert entweder eine unspezifische Aufnahme von Peptiden im Allgemeinen oder lässt vermuten, dass die Pflanzenzellen durch den Vorgang der Protoplastierung ihre Selektivität für Aufnahme verloren haben. Eine Aufnahme des Tin3-Effektorproteins konnte bisher weder für das Volllängen-Protein noch für Tin3-Peptide überzeugend bewiesen werden. Zur Zeit wird in einer Kooperation mit K. Snetselaar (Philadelphia) versucht, HA-Fusionsproteine von Tin3 mittels Immunoelektronenmikroskopie (IEM) in Pflanzenzellen infizierter Maisblätter nachzuweisen, wie es bereits für *U. maydis* Effektor Cmu1 gezeigt werden konnte (Djamei *et al.*, 2011).

3.9 Tin3 unterdrückt das pflanzliche Immunsystem

Die duale Funktion von Tin3 lässt vermuten, dass Tin3 eine essenzielle Rolle bei der Unterdrückung von pflanzlichen Abwehrprozessen spielt. Einen ersten Hinweis gaben Mikroarray-Analysen der *tin3* Mutante, die eine Induktion von Abwehr-relevanten Genen im Vergleich zu SG200 demonstrierten (Thomas Brefort, pers. Mitteilung). Infektionen mit SG200 Δ *tin3* zeigten zudem eine verstärkte Produktion von H₂O₂ (vgl. Abb. 34). Dabei akkumuliert H₂O₂ vorallem in Mesophyllzellen von SG200 Δ *tin3* penetrierten Zellen. Generell sind ROS Schlüsselkomponenten der pflanzlichen Abwehr und erfüllen hierbei variable Rollen, wie beispielsweise die Schädigung von Proteinen, Lipiden oder DNA durch oxidative Angriffe sowie auch die Signalweiterleitung, die Verstärkung der Zellwand oder antimikrobielle Effekte (Thordal-Christensen *et al.*, 1997; Apel *et al.*, 2004). Vor allem H₂O₂, welches stabiler als die meisten ROS ist, besitzt eine wichtige Rolle als Signalmolekül (Thordal-Christensen *et al.*, 1997). Die schnelle Bildung von ROS als Teil der Pflanzenabwehr bezeichnet man als oxidativen „Burst“ (Lamb *et al.*, 1997). Die erste Stufe des oxidativen „Burst“ beschreibt die PAMP-induzierte Produktion von

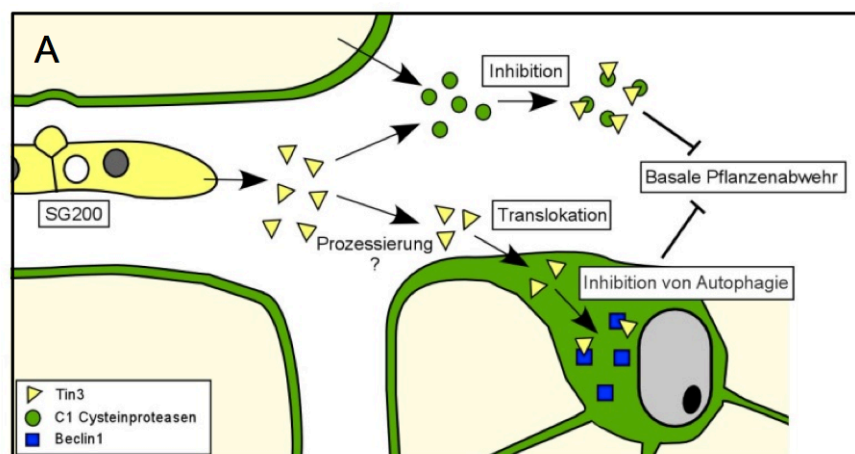
ROS als eine der initialen Reaktionen der basalen Pflanzenabwehr. Die zweite Stufe wird durch die Erkennung von Avr-Proteinen vermittelt und beinhaltet eine gesteigerte Produktion von ROS, die als HR bezeichnet wird und letztendlich zum Zelltod führt (Lamb *et al.*, 1997). Im Fall der *tin3* Deletionsmutante zeigt sich zwar eine verstärkte Produktion von ROS, diese ist allerdings nicht der Blockierung des Pilzes verbunden und lässt damit die Vermutung zu, dass es sich hierbei um eine PAMP-induzierte Reaktion des basalen Immunsystems der Pflanze handelt. Diese Beobachtung wird durch die vermutete duale Funktionalität von Tin3 als Cysteinprotease- und Autophagie-Inhibitor weiter unterstützt. Cysteinproteasen spielen in der Pflanzenabwehr essenzielle Rollen, die von der direkten Abwehr, über Signalweiterleitungen oder Perzeption reichen. Denkbar wäre eine Beteiligung der Proteasen an PAMP/DAMP (damage-associated molecular patterns)-Signaltransduktionen durch die Freisetzung von Peptiden, die als PAMPs/DAMPs dienen und SA- und JA-Immunantworten auslösen (van der Hoorn *et al.*, 2004; Huffaker *et al.*, 2006; Pearce *et al.*, 2010). Des Weiteren konnte eine direkte Aktivierung von SA-Signalwegen und PR (pathogenesis-related)-Genen durch pflanzliche Cysteinproteasen gezeigt werden (van der Linde *et al.*, 2012). Tin3 ist also in der Lage durch die Inhibition dieser Proteasen die Signalweiterleitung innerhalb der Pflanze oder die Erkennung von *U. maydis* zu verhindern (Abb. 37). Die beobachteten Auswirkungen der Tin3 Inhibitor-Funktion auf die Virulenz von *U. maydis* zeigen eindeutig die biologische Relevanz der Funktion während der Unterdrückung der basalen Immunität. Ein solcher Zusammenhang konnte bereits in anderen Pathosystemen beschrieben werden. Der *C. fulvum* Effektor Avr2 ist beispielsweise ein Virulenzfaktor, der Abwehr-induzierte Tomaten-Proteasen inhibiert (van Esse *et al.*, 2008).

Im Falle der Autophagie wurden sehr konträre Funktionen während der Pflanzenabwehr beschrieben, die sowohl zellschützende als auch zellschädigende Eigenschaften haben könnten (Seay *et al.*, 2006; Williams *et al.*, 2008; Hayward *et al.*, 2009). Im Falle des *U. maydis* – Mais Pathosystems sind vor allem zellschädigende Aufgaben zu vermuten. In Pflanzen zeigt Autophagie sehr viele Parallelen zu apoptotischem Zelltod, wodurch eine direkte Beteiligung am HR-bedingten Zelltod nicht auszuschließen ist (Baehrecke, 2005; Levine *et al.*, 2005). Zudem ist in Säugetieren bekannt, dass Autophagie für die Aktivierung von PRRs und Toll-ähnlichen Rezeptoren verantwortlich ist, was wiederum zur Aktivierung von Abwehrmechanismen führt (Delgado *et al.*, 2009). Homologe dieser Rezeptoren sind auch in Pflanzen zu finden und es wäre denkbar, dass auch in Pflanzen eine Beteiligung von Autophagie an der Induktion von Signalkaskaden vorliegt.

Interessanterweise können die Toll-ähnlichen Rezeptoren auch selbst Autophagieprozesse auslösen (Xu *et al.*, 2007; Delgado *et al.*, 2008). Es wäre also denkbar, dass Tin3 durch die Inhibition von Autophagie die Toll-aktivierte Signalweiterleitung und dadurch ausgelöste Abwehrmechanismen unterbindet.

Des Weiteren ist Autophagie in einigen Fällen an der Begrenzung des programmierten Zelltods auf die Infektionsstelle des Pathogens beteiligt, wie es bereits für Pathogene in *Arabidopsis* und Tabak beschrieben wurde (Liu *et al.*, 2005; Patel *et al.*, 2008). Diese Funktion wäre allerdings nur im Falle der Effektor-induzierten HR von Belang. Die Tatsache, dass *tin3* Mutanten nur eine schwache basale Pflanzenreaktion zeigen, lässt allerdings vermuten, dass Autophagie an der basalen PAMP-induzierten Abwehr beteiligt ist, während die Effektor-induzierte Abwehr, also der HR-induzierte Zelltod eher apoptotischen Ursprungs ist. Eine Rolle während der pflanzlichen Basalresistenz konnte hierbei bereits für unterschiedliche Atg-Proteine gezeigt werden (Lenz, 2011). Insgesamt ist die Abgrenzung von Apoptose und Autophagie in Pflanzen nicht eindeutig, da sich beide Prozesse stark überschneiden und durch die gleichen Signale induziert werden können (Shintani *et al.*, 2004; Williams *et al.*, 2008).

Darüber hinaus dient Autophagie der direkten Abwehr von intra- und extrazellulären Pathogenen, wie es bereits für das Herpes Simplex Virus (Levine *et al.*, 2005; Talloczy *et al.*, 2006) oder *Mycobacterium tuberculosis* (Gutierrez *et al.*, 2004; Colombo *et al.*, 2006) gezeigt werden konnte. In diesem Zusammenhang könnte Autophagie auch die Eliminierung von translozierten Effektorproteinen bewirken. In so einem Szenario hätte Tin3 durch die Inhibition von Autophagie eine Schutzfunktion für andere translozierte Effektorproteine.



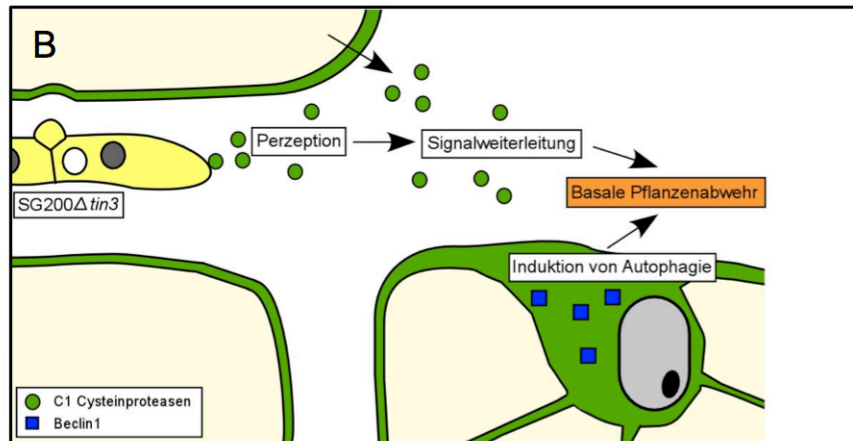


Abb. 37: **Modell der möglichen Wirkungsweise des Tin3 Effektorproteins.** In SG200 Infektionen (A) wird Tin3 in den apoplastischen Spalt sekretiert und inhibiert dort Cysteinproteasen, während eine Subfraktion des Effektorproteins in die Pflanze transloziert und durch die Interaktion mit Beclin1 Autophagie inhibiert. Beide Funktionen dienen der Unterdrückung der basalen PAMP-induzierten Abwehrreaktionen der Pflanze. Im Gegensatz hierzu fehlt in SG200 $\Delta tin3$ Infektionen (B) Tin3 und die Unterdrückung der basalen Abwehr ist nicht vollständig. Cysteinproteasen sind hierbei an der Perzeption des Pathogens und SA-abhängigen Signalweiterleitung beteiligt, während Autophagie vor allem zellschädigende Effekte besitzen könnte. Beide Vorgänge führen zur Aktivierung von Abwehrreaktionen, die sich durch H₂O₂ Ablagerungen in der Pflanze sowie einen Proliferationsdefekt und verminderte Virulenz des Pilzes bemerkbar macht.

Bedingt durch die starke Expression von Tin3 könnte man in einem Modell für die Wirkungsweise dieses Effektors spekulieren, dass ein Teil des sekretierten Proteins als Proteaseinhibitor in der apoplastischen Interaktionszone verbleibt, während der andere Teil als Volllängen-Protein oder als prozessiertes Peptid in die Pflanzenzelle aufgenommen wird und dort mit Beclin1 interagiert um Autophagieprozesse zu unterdrücken (Abb. 37 A). Insgesamt sprechen beide Funktionen für eine Beteiligung von Tin3 an der Unterdrückung der basalen pflanzlichen Abwehrmechanismen, um die biotrophe Interaktion zwischen Pflanze und Pilz zu etablieren.

4 Material und Methoden

4.1 Material und Bezugsquellen

4.1.1 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien waren von der Qualität *p. a.* und wurden vorwiegend von den Firmen Difco (Augsburg), Fluka (Buchs/Schweiz), Merck (Darmstadt), Riedel-de-Haën (Seelze), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen.

4.1.2 Puffer und Lösungen

Standardpuffer und -lösungen wurden nach Ausubel *et al.* (1987) und Sambrook *et al.* (1989) hergestellt. Spezielle Puffer und Lösungen sind unter den jeweiligen Methoden aufgeführt. Alle Medien, Lösungen und Puffer wurden, soweit notwendig, vor Verwendung für 5 min bei 121°C autoklaviert. Hitzeempfindliche Lösungen wurden mit Hilfe eines Filteraufsatzes (Porengröße 0,2 µm; Merck, Darmstadt) sterilfiltriert.

4.1.3 Enzyme und Antikörper

Restriktionsenzyme wurden von der Firma New England Biolabs (NEB, Frankfurt) bezogen. Als DNA-Polymerasen wurden Phusion Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes/NEB, Frankfurt) und Taq DNA-Polymerase (Fermentas, St. Leon-Roth) verwendet. Die Ligation von DNA-Molekülen wurde mit T4 DNA Ligase (Roche, Mannheim) durchgeführt. Der enzymatische Abbau von Zellwänden erfolgte mit Lysozym (Roche, Mannheim) und Novozym 234 (Novo Nordisc; Kopenhagen, Dänemark). Antikörper wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (Deisenhofen), Cell Signaling Technology (Danvers, USA) und IBA GmbH (Göttingen) bezogen. Eine detaillierte Auflistung der Antikörper findet sich in Kapitel 4.6.3.3.

4.1.4 Verwendete Kits

Zur Elution von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen und zur Aufreinigung von PCR-Produkten und anderen Enzymreaktionen wurde das Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Mannheim) und das MinElute PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Für die Aufreinigung von Plasmiden wurde das QIAprep Mini Plasmid Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Das TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, Karlsruhe) wurde zur Klonierung von PCR-Produkten benutzt. Spezielle Kits sind unter den jeweiligen Methoden aufgeführt.

4.2 Zellkultivierung

4.2.1 Kultivierung von *E. coli* und *A. tumefaciens*

E. coli sowie *A. tumefaciens* Stämme wurden in dYT-Medium (Sambrook *et al.*, 1989) bei 37°C bzw. bei 28°C und 200 Upm kultiviert. Antibiotikazugaben erfolgten nach den in Tabelle 2 angegebenen Konzentrationen. Dauerkulturen wurden durch Zugabe von 25 % (v/v) Glycerin hergestellt und bei -80°C gelagert.

Tabelle 2: Antibiotikakonzentrationen für Bakterienkulturen

Antibiotikum	Stammlösung [mg/ml]	Endkonzentration [µg/ml]
Ampicillin	10	100
Kanamycin	10	50
Rifampicin	50	50
Gentamycin	50	40
Tetracyclin	2,5	2,5
Zeocin	100	100

dYT-Flüssigmedium (Sambrook *et al.*, 1989):

1,6 % (w/v) Trypton-Pepton

1,0 % (w/v) Hefeextrakt

0,5 % (w/v) NaCl

in H₂O_{bid}

YT- Festmedium:

0,8 % (w/v) Trypton-Pepton
0,5 % (w/v) Hefeextrakt
0,5 % (w/v) NaCl
1,3 % (w/v) Bactoagar
in H₂O_{bid}

Für die Amplifizierung von *P. pastoris* Vektoren, die Zeocin-Resistenz vermitteln, wurden *E. coli* Kulturen in *Low Salt* Luria-Bertani (LB)-Medium kultiviert.

Low Salt LB-Medium, pH 7,0:

1 % (w/v) Trypton
0,5 % (w/v) Hefeextrakt
0,5 % (w/v) NaCl [1,5 % (w/v) Agar für Festmedium]
in H₂O_{bid}

4.2.2 Kultivierung von *S. cerevisiae*

S. cerevisiae wurde bei 28°C und 200 Upm aerob angezogen. Als Vollmedium diente YEPD-Medium, während für auxotrophe Stämme SD-Medium mit den entsprechenden Aminosäure-Zusätzen eingesetzt wurde. Für Dauerkulturen wurde 25 % (v/v) Glycerin zu einer dicht gewachsenen Kultur gegeben. Die Lagerung erfolgte bei -80°C. Für Hefe Zwei-Hybrid-Analysen und Komplementationsanalysen wurden die Transformanten in entsprechendem SD-Selektionsmedium zu einer OD₆₀₀ von 0,8 angezogen und auf eine OD₆₀₀ von 1,0 in H₂O_{bid} eingestellt. In dreistufigen, seriellen Verdünnungsreihen (1:10) wurden je 5 µl dieser Suspensionen auf entsprechendes SD-Festmedium getropft und die Platten bei 28°C inkubiert.

YEPD-Medium:

2 % (w/v) Pepton (Difco)
1 % (w/v) Hefeextrakt
in H₂O_{bid}
[Festmedium: 2 % (w/v) Bactoagar]

SD-Basismedium:

0,67 % (w/v) Yeast Nitrogen Base w/o amino acids
2 % Glucose (nach dem Autoklavieren)
in H₂O_{bid}
[Festmedium: 2 % (w/v) Bactoagar]

Aminosäure-Zusätze:

0,002 % (w/v) L-Adenin Hemisulfat
0,002 % (w/v) L-Arginin HCl
0,002 % (w/v) L-Histidin HCl
0,003 % (w/v) L-Isoleucin
0,01 % (w/v) L-Leucin
0,003 % (w/v) L-Lysin HCl
0,002 % (w/v) L-Methionin
0,005 % (w/v) L-Phenylalanin
0,02 % (w/v) Threonin
0,002 % (w/v) L-Tryptophan
0,003 % (w/v) L-Tyrosin
0,002 % (w/v) L-Uracil
0,015 % (w/v) L-Valin

4.2.3 *P. pastoris*

Die Kultivierung von *P. pastoris* wurde nach dem Invitrogen „EasySelect *Pichia* Expression Kit“ Handbuch in BMGY- und BMMY-Medium bei 28°C und 200 Upm durchgeführt.

BMGY/BMMY-Medium:

1 % (w/v) Hefeextrakt
2 % (w/v) Pepton
100 mM KH₂PO₄, pH 6,0
1,34 % (w/v) Yeast Nitrogen Base w/o amino acids
4 x 10⁻⁵ % (w/v) Biotin
1 % (v/v) Glycerin (BMGY) bzw.
0,5 % (v/v) Methanol (BMMY)

4.2.4 Kultivierung von *U. maydis*

U. maydis Kulturen wurden standardmäßig in YEPS_{light} Flüssigmedium bei 200 Upm inkubiert. Für Festmedien wurden Potato-Dextrose (PD)-Agarplatten verwendet, die wenn notwendig mit dem Antibiotikum Carboxin (5 µg/ml) versetzt wurden. Die dauerhafte Lagerung von *U. maydis* Kulturen erfolgte bei -80°C unter Zugabe von 50 % NSY-Glycerin zu einer dicht gewachsenen Kultur.

YEPS_{light} (modifiziert nach Tsukuda *et al.* (1988)):

1 % (w/v) Hefeextrakt
1 % (w/v) Pepton

1 % (w/v) Saccharose
in H₂O_{bid}

Potato-Dextrose-Agar (PD):

3,9 % (w/v) Potato Dextrose Agar
in H₂O_{bid}

PD-Aktivkohle:

wie PD, jedoch zusätzlich
1,0 % (w/v) Aktivkohle

NSY-Glycerin:

0,8 % (w/v) Nutrient Broth
0,1 % (w/v) Hefeextrakt
0,5 % (w/v) Saccharose
69,6 % (v/v) Glycerin
in H₂O_{bid}

Für Stressversuche wurden Complete Medium (CM) Platten verwendet, die nach dem Autoklavieren mit Kongorot (70 µg/ml), Calcofluor white (45 µg/ml) oder H₂O₂ (1,5 mM) versetzt wurden. NaCl (1 M) wurde vor dem Autoklavieren zugegeben. Um die Sensitivität gegenüber den jeweiligen Stressoren zu testen wurden *U. maydis* Stämme in YEPS_{light} auf eine OD₆₀₀ von 0,8 angezogen und anschließend mit H₂O_{bid} auf eine OD₆₀₀ von 1,0 ankonzentriert. In dreistufigen, seriellen Verdünnungsreihen (1:10) wurden je 5 µl dieser Suspensionen auf entsprechendes Festmedium getropft. Filamentöses Wachstum wurde auf PD-Aktivkohle-Platten getestet.

CM Vollmedium (Holliday, 1974):

0,15 % (w/v) NH₄NO₃
0,25 % (w/v) Casaminosäuren
0,05 % (w/v) Heringsperma-DNA
0,1 % (w/v) Hefeextrakt
1 % (v/v) Vitaminlösung (s.u.)
6,25 % (v/v) Salzlösung (s.u.)
2 % Glucose (nach dem Autoklavieren)
in H₂O_{bid}; pH 7,0 (mit NaOH)
[Festmedium: 2 % (w/v) Bactoagar]

Vitaminlösung (Holliday, 1974):

0,1 ‰ (w/v) Thiamin
0,05 ‰ (w/v) Riboflavin
0,05 ‰ (w/v) Pyridoxin
0,2 ‰ (w/v) Kalziumpantothentat

0,05 ‰ (w/v) para-Aminobenzoesäure
0,2 ‰ (w/v) Nikotinsäure
0,2 ‰ (w/v) Cholinchlorid
1,0 ‰ (w/v) myo-Inositol
in H₂O_{bid}; sterilfiltriert

Salzlösung (Holliday, 1974):

1,6 ‰ (w/v) KH₂PO₄
0,8 ‰ (w/v) KCl
0,4 ‰ (w/v) MgSO₄ x 7H₂O
0,1 ‰ (w/v) CaCl₂ x 2H₂O
0,8 ‰ (v/v) Spurenelementlösung (s.u.)
in H₂O_{bid}

Spurenelementlösung:

0,06 ‰ (w/v) H₃BO₃
0,14 ‰ (w/v) MnCl x 4H₂O
0,4 ‰ (w/v) ZnCl₂
0,4 ‰ (w/v) Na₂MoO₄ x 2H₂O
0,1 ‰ (w/v) FeCl₃ x 6H₂O
0,03 ‰ (w/v) CuSO₄
in H₂O_{bid}

Für *U. maydis* Stamm AB33 und dessen Derivate wurde Ammonium-Minimalmedium (AM-MM) bzw. Nitrat-Minimalmedium (NM-MM) verwendet, um den Nitrat-induzierbaren Promotor *Pnar* zu reprimieren bzw. zu induzieren.

AM-MM (Holliday, 1974):

0,3 ‰ (w/v) (NH₄)₂SO₄
6,25 ‰ (v/v) Salzlösung (s. o.)
in H₂O_{bid}; pH 7,0 (NaOH)
nach dem Autoklavieren: 2 ‰ (w/v) Glucose

NM-MM (Holliday, 1974):

0,3 ‰ (w/v) KNO₃
6,25 ‰ (v/v) Salzlösung (s. o.)
in H₂O_{bid}; pH 7,0 (NaOH)
nach dem Autoklavieren: 2 ‰ (w/v) Glucose

4.2.5 Bestimmung der Zelldichte

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch in einem NovaspecII Gerät (Pharmacia Biotech/GE Lifesciences, München) bei 600 nm (OD₆₀₀) bestimmt. Um eine

lineare Abhängigkeit der Messwerte sicherzustellen wurden Kulturen durch entsprechende Verdünnungen auf Werte unter eine OD₆₀₀ von 0,8 verdünnt. Als Referenzwert wurde die OD₆₀₀ des entsprechenden Kulturmediums verwendet. Bei *U. maydis* und *S. cerevisiae* entspricht eine OD₆₀₀ von 1,0 etwa einer Zellzahl von $1-5 \times 10^7$ Zellen. Bei *E. coli* entspricht dieser Wert etwa 1×10^9 Bakterienzellen.

4.3 Stämme, Oligonukleotide und Plasmide

4.3.1 *E. coli* Stämme

Alle in dieser Arbeit verwendeten *E. coli* Stämme und deren Verwendung sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Verwendete *E. coli* Stämme

Stamm	Genotyp	Verwendungszweck	Referenz
K-12 Top10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacO</i> 74 <i>recA1</i> <i>ara</i> Δ139 Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK</i> <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>	Klassische Klonierung / Plasmidamplifikation	(Grant <i>et al.</i> , 1990), Invitrogen (Karlsruhe)
One Shot® <i>ccdB</i> Survival™ 2 T1R	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX</i> 74 <i>recA1</i> <i>ara</i> Δ139 Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK</i> <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG fhuA::IS2</i>	Klonierung von Gateway- Destinationsvektoren	Invitrogen (Karlsruhe)
BL21(DE3)pLysS	F ⁻ <i>ompT hsdSB</i> (rB-,mB-) <i>gal dcm</i> (DE3) pLys (CamR)	Proteinexpression	Invitrogen (Karlsruhe)

4.3.2 *A. tumefaciens* Stämme

Für die transiente Expression von Proteinen in *N. benthamiana* wurde der *A. tumefaciens* Stamm GV3101 verwendet (Koncz *et al.*, 1986), der eine chromosomale Rifampicin-Resistenz besitzt. Des Weiteren ist in diesem Stamm das Ti-Plasmid pMP90 enthalten, welches die für den DNA-Transfer nötigen *vir-Gene* codiert, jedoch mit einer ansonsten unfunktionellen T-DNA-Region ausgestattet ist. Das Ti- Plasmid vermittelt Gentamycin-Resistenz. Außerdem enthält der verwendete Stamm eine auf dem Ti-Helferplasmid lokalisierte Tetracyclin-Resistenz. Dieses Plasmid vermittelt *in trans* die Replikation der Plasmide in *A. tumefaciens*. Bei den weiterhin zur Transformation von *A. tumefaciens* verwendeten Plasmiden handelt es sich um pBIN19AN-Derivate (vgl. 4.3.6), welche eine Kanamycin-Resistenz vermitteln.

4.3.3 *S. cerevisiae* Stämme

Der Hefestamm AH109 (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) wurde für alle Hefe Zwei-Hybrid-Analysen in dieser Arbeit verwendet. Für Hefe Autophagie-Analysen wurde der BY4741 Wildtypstamm sowie ein *atg6* Deletionsstamm (YPL120w) verwendet. In Tabelle 4 sind die in dieser Arbeit verwendeten *S. cerevisiae* Stämme aufgelistet.

Tabelle 4: Verwendete *S. cerevisiae* Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
AH109	<i>MATa trp1-901 leu2-3 ura3-52 his3-200 gal4Δ gal80Δ</i> <i>LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3 GAL2_{UAS}-GAL1_{TATA}-ADE2</i> <i>URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ</i>	A. Holtz, nicht publiziert
BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	(Brachmann <i>et al.</i> , 1998), Euroscarf (Frankfurt)
YPL120w (BY4741Δ <i>atg6</i>)	<i>BY4741 MATa his3D1 leu2D0 met15D0 ura3D0</i> <i>YPL120w::kanMX4</i>	Euroscarf (Frankfurt)

4.3.4 *U. maydis* Stämme

In Tabelle 5 sind die verwendeten *U. maydis* Ausgangsstämme aufgeführt. Die in dieser Arbeit hergestellten Stämme wurden durch die Integration von Genen in den *ip*-Locus (*sdh2*) generiert. Hierfür wurden Plasmide verwendet, die ein Carboxin-resistentes *ip*-Allel (*ipR*) tragen (Broomfield *et al.*, 1992) und über homologe Rekombination mit dem endogenen, Carboxin-sensitiven *ip*-Allel (*ipS*) in das Genom von *U. maydis* eingebracht wurden. Alle Stämme wurden durch Southern-Blot-Analysen verifiziert. In Stämmen, die eine Insertion im *ip*-Locus tragen, ist das entsprechende Konstrukt, wenn nicht anders gekennzeichnet, in einfacher Kopie inseriert. Die Plasmide zur Herstellung der Stämme sind in Kapitel 4.3.6 beschrieben.

Tabelle 5: Verwendete *U. maydis* Stämme

Stamm	Genotyp	Resistenz ¹	Referenz
SG200	<i>a1:mfa2 bW2bE1</i>	P	(Kämper <i>et al.</i> , 2006)
AB33	<i>a2 P_{nar}:bW2bE1</i>	P	(Brachmann <i>et al.</i> , 2001)
SG200Δ <i>tin3</i>	<i>a1:mfa2 bW2bE1 Δtin3</i>	P, H	Thomas Brefort, pers. Mitteilung
SG200Δ <i>tin3/tin3</i>	<i>a1:mfa2 bW2bE1 Δtin3</i> <i>ip^R[P_{tin3}:tin3]ip^S</i>	P, H, C	Thomas Brefort, pers. Mitteilung
SG200- <i>tin3</i> -eGFP	<i>a1:mfa2 bW2bE1</i> <i>ip^R[P_{otef}:tin3:eGFP]ip^S</i>	P, C	Thomas Brefort, pers. Mitteilung

¹ Phleomycin (P), Hygromycin (H), Carboxin (C)

Tabelle 6: In dieser Arbeit generierte *U. maydis* Stämme

Stamm	Genotyp	Resistenz ¹	Ausgangsstamm
AB33 <i>tin3</i> -HA	<i>a2 P_{nar}:bW2bE1 ip^R[P_{oterf:tin3:HA}]ip^S</i>	P, C	AB33
SG200Δ <i>tin3/tin3</i> Δ ₁₀₀₋₂₆₅	<i>a1:mfa2 bW2bE1 Δtin3 ip^R[P_{tin3:tin3}Δ₁₀₀₋₂₆₅]ip^S</i>	P, H, C	SG200Δ <i>tin3</i>
SG200Δ <i>tin3/tin3</i> Δ ₅₅₋₉₉ -HA	<i>a1:mfa2 bW2bE1 Δtin3 ip^R[P_{tin3:tin3}Δ₅₅₋₉₉:HA]ip^S</i>	P, H, C	SG200Δ <i>tin3</i>
SG200Δ <i>tin3/epic1</i> -HA	<i>a1:mfa2 bW2bE1 Δtin3 ip^R[P_{tin3:epic1:HA}]ip^S</i>	P, H, C	SG200Δ <i>tin3</i>
SG200Δ <i>tin3/tin3</i> ¹⁻²¹ -HA- <i>tin3</i> ²²⁻²⁶⁵ -HA	<i>a1:mfa2 bW2bE1 Δtin3 ip^R[P_{tin3:tin3}(aa21:HA):HA]ip^S</i>	P, H, C	SG200Δ <i>tin3</i>
SG200Δ <i>tin3/tin3</i> ¹⁻⁹⁹ -HA- <i>tin3</i> ¹⁰⁰⁻²⁶⁵ -HA	<i>a1:mfa2 bW2bE1 Δtin3 ip^R[P_{tin3:tin3}(aa99:HA):HA]ip^S</i>	P, H, C	SG200Δ <i>tin3</i>
SG200Δ <i>tin3/pit2</i> -HA	<i>a1:mfa2 bW2bE1 Δtin3 ip^R[P_{tin3:pit2:HA}]ip^S</i>	P, H, C	SG200Δ <i>tin3</i>
SG200Δ <i>tin3/tin3</i> Δ _{22-54, 99-265}	<i>a1:mfa2 bW2bE1 Δtin3 ip^R[P_{tin3:tin3}Δ_{22-55, 99-265}]ip^S²</i>	P, H, C	SG200Δ <i>tin3</i>

¹ Phleomycin (P), Hygromycin (H), Carboxin (C)² Mehrfachintegration im *ip*-Lokus

4.3.5 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide, die zur Herstellung von Plasmiden sowie für quantitative real-time PCRs verwendet wurden, sind in Tabelle 7 aufgelistet.

Tabelle 7: Verwendete Oligonukleotide

Lauf-nummer	Name	Sequenz ¹	Verwendung ²
3	10556_NotI_re	GATCGCGGCCGCGCCGATGACGTTCCCT CATCG	Amplifizierung von <i>tin3</i> ohne Stop-Codon, führt NotI Schnittstelle ein [R]
4	10556dSP_EcoRI_uni	GATCGAATTCGTGAACTCCCTCTTATT CC	Amplifizierung von <i>tin3</i> ohne Signalpeptid, führt EcoRI Schnittstelle ein [F]
5	<i>mir3</i> _EcoRI_fw	GATCGAATTCGGACTAATGTCGATCGT G	Amplifizierung von <i>mir3</i> ohne Signalpeptid, führt EcoRI Schnittstelle ein [F]
15	<i>mir3</i> _BamHI_re	GATCGGATCCTTACTTGCCAGGG	Amplifizierung von <i>mir3</i> , führt BamHI Schnittstelle ein [R]
18	<i>mir3</i> _NotI_rv	GATCGCGGCCGCCCCAGGCTGCTGAC GAC	Amplifizierung von <i>mir3</i> ohne Signalpeptid, führt NotI Schnittstelle ein [F]

32	p123_HA_fw	GTCCCCGACTATGCCTAAAGCGGCCG CCCGGCTGCAG	Inverse PCR zur Integration eines HA- Epitops in <i>tin3</i> , enthält 3'- Hälfte des HA-Epitops [F]
33	p123_HA_rev	GTCGTAGGGATACCGCGGGCCGCCCG ACGATGACGTTCC	Inverse PCR zur Integration eines HA- Epitops in <i>tin3</i> , enthält 5'- Hälfte des HA-Epitops [R]
34	10556_NcoI_fw	GATCCCATGGTGAACTCCCTCTTATT CC	Amplifizierung von <i>tin3</i> ohne Signalpeptid, führt NcoI Schnittstelle ein [F]
35	Pnat_Sbfl_fw	GATCCCTGCAGGGTGCATGTGGCCTC ACCTG	Amplifizierung des native Promotors von <i>tin3</i> , führt eine SbflI Schnittstelle ein [F]
37	10556_NcoI_SP_fw	GATCCCATGGATGAAGTGCTTCAGCTT C	Amplifizierung von <i>tin3</i> , führt NcoI Schnittstelle ein [F]
38	10556_BsaI_iBA101_fw	GATCGGTCTCGAATGGTGAACTCCCT CTTATTC	Amplifizierung von <i>tin3</i> ohne Signalpeptid, führt BsaI Schnittstelle ein [F]
39	10556_BsaI_iBA101_rev	GATCGGTCTCGGCGCTCGATGACGTTC CCTCATCG	Amplifizierung von <i>tin3</i> ohne Signalpeptid und ohne Stop-Codon, führt BsaI Schnittstelle ein [R]
40	<i>mir3</i> _BsaI_iBA101_fw	GATCGGTCTCGAATGGGACTAATGTGCG ATCGTG	Amplifizierung von <i>mir3</i> ohne Signalpeptid, führt BsaI Schnittstelle ein [F]
41	<i>mir3</i> _BsaI_iBA101_rev	GATCGGTCTCGGCGCTCTTGCCAGG GTTTCG	Amplifizierung von <i>mir3</i> ohne Signalpeptid und ohne Stop-Codon, führt BsaI Schnittstelle ein [R]
42	<i>arf1</i> _EcoRI_fw	GATCGAATTCATGGCGGAGGCCGGCG TG	Amplifizierung von <i>arf1</i> , führt eine EcoRI Schnittstelle ein [F]
43	<i>arf1</i> _BamHI_rev	GATCGGATCCATCAGTCCTTATCAGCA GC	Amplifizierung von <i>arf1</i> , führt eine BamHI Schnittstelle ein [R]
44	<i>suf4</i> _NdeI_fw	GATCCATATGGGGAAGAAGAAGC GCG	Amplifizierung von <i>suf4</i> , führt eine NdeI Schnittstelle ein [F]
45	<i>suf4</i> _BamHI_rev	GATCGGATCCCTAGTTTTGCTGGCTAG	Amplifizierung von <i>suf4</i> , führt eine BamHI Schnittstelle ein [R]
46	<i>beclin1</i> _XhoI_rev	GATCCTCGAGTTAACTCTTGTCTTCAG	Amplifizierung von <i>beclin1</i> , führt eine XhoI Schnittstelle ein [F]
47	<i>beclin1</i> _XmaI_fw	GATCCCCGGGTATGAAGCCCCCG	Amplifizierung von <i>beclin1</i> , führt eine XmaI Schnittstelle ein [R]

51	10556_NotI+G_rev	GATCGCGGCCGCGCGATGACGTTCCC TCATCG	Amplifizierung von <i>tin3</i> , führt eine NotI Schnittstelle ein [R]
61	10556_Hacomp_rev	GATCGCGGCCGCTTAATAGTCGGGA CGTCGTAGGGATACGATGACGTTCCCT CATCGATGAAGACGTATTCCTTTCCATC	Amplifizierung von <i>tin3</i> , enthält vollständige Sequenz des HA-Epitops für Fusionierung mit 5'- Ende von <i>tin3</i> , führt NotI Schnittstelle ein [R]
64	<i>mir3</i> _MUT_C	CAGCTGCGGGAGCGGTTGGGCTTCT C	Mutagenese von <i>mir3</i> (C157G) [F]
65	<i>mir3</i> _MUT_H	GAACAGCGCTGGACGATGGTGTACG GC	Mutagenese von <i>mir3</i> (H293D) [F]
70	<i>tin3</i> _De ₅₅₋₉₉ _fw	ATCTACGATGAGCTTCAAAGAGGTCGT GTGG	Inverse PCR um die Aminosäuren 55-99 in <i>tin3</i> zu deletieren [F]
71	<i>tin3</i> _De ₅₅₋₉₉ _re	CTTGTGTGGAGGAATCAGCTCGTTTG	Inverse PCR um die Aminosäuren 55-99 in <i>tin3</i> zu deletieren [R]
74	iBA_strep_stop_re	TTATTTCTCGAACTGCGGGTGGCT CCAAG	Inverse PCR um ein Stop-Codon nach dem ersten <i>Strep</i> -Tag einzufügen [F]
75	iBA_strep_stop_fw	GGTGGAGGTTCCGGAGGTGGATC GGGAG	Inverse PCR um ein Stop-Codon nach dem ersten <i>Strep</i> -Tag einzufügen [F]
88	<i>tin3</i> pep_NcoI_fw	GATCCCATGGGGCTGGCTAGCAAGTT CTATCG	Amplifizierung von <i>tin3</i> ⁵⁵⁻⁹⁹ , führt NcoI Schnittstelle ein [F]
89	<i>tin3</i> pep_NotI+G_re	GATCGCGGCCGCGTTATGGCTTCACTC TGAGGTGC	Amplifizierung von <i>tin3</i> ⁵⁵⁻⁹⁹ , führt NotI Schnittstelle ein [R]
100	<i>mir3</i> _PspOMI_fw	GATCGGGCCCATGGCTGCCTCCACCA CGGC	Amplifizierung von <i>mir3</i> , führt PspOMI Schnittstelle ein [F]
101	<i>mir3</i> _NotI+G_rev	GATCGCGGCCGCCCCAGGCTGCTGA CGAC	Amplifizierung von <i>mir3</i> , führt NotI Schnittstelle ein [R]
106	<i>beclin1</i> _BspHI_re	GCGCTCATGATTAACCTTTGTTCTTCAG	Amplifizierung von <i>beclin1</i> , führt BspHI Schnittstelle ein [R]
107	<i>beclin1</i> _SpeI_fw	GATCACTAGTATGAAGCCCCCG	Amplifizierung von <i>beclin1</i> , führt BspHI Schnittstelle ein [F]
110	66281_EcoRI_fw	GATCGAATTCGCGGACATGTCGATCGT GTCCTACGGGGAG	Amplifizierung von <i>zm66281</i> , führt EcoRI Schnittstelle ein [F]
111	66281_BamHI_rev	GATCGGATCCTTATGCGCTGCTCTTCA	Amplifizierung von

		TTCCGTC	<i>zm66281</i> , führt BamHI Schnittstelle ein [R]
126	<i>tin3_RT-PCR_fw</i>	CAACGCTTTCGATGACCTTG	Für qPCR, amplifiziert <i>tin3</i> [F]
127	<i>tin3_RT-PCR_rev</i>	AGATCGGAGTACGTGGTTTC	Für qPCR, amplifiziert <i>tin3</i> [R]
130	<i>mir3_strep_re</i>	GATCGCGGCCGCTTTCTCGAACTGC GGGTGGCTCCAGCCGCGCTTGGCCAG GGTTCGCTTCGTAGCCTTCAC	Amplifizierung von <i>mir3</i> mit <i>Strep</i> -Tag ohne Stop-Codon, führt NotI Schnittstelle ein [R]
131	<i>mir3_woG_re</i>	GATCGCGGCCGCTTTCTCGAACTGC GGGTGGCTCCAGCGCCGGGTCGGG GACGGCGGGCTG	Amplifizierung von <i>mir3</i> ohne Granulin-Domäne (aa 371-428) mit <i>Strep</i> -Tag ohne Stop-Codon, führt NotI Schnittstelle ein [R]
133	<i>tin3_Pep_BamHI_re</i>	GATCGGATCCGTTATGGCTTCACTCTG AGGTGC	Amplifizierung von <i>tin3</i> ⁵⁵⁻⁹⁹ , führt eine BamHI Schnittstelle ein [R]
134	<i>tin3_BamHI_re</i>	GATCGGATCCTTACGATGACGTTCCCT CATCG	Amplifizierung von <i>tin3</i> , führt eine BamHI Schnittstelle ein [R]
135	<i>Pnat_NcoI_re</i>	GATCCCATGGTTTGCCCGGAAAGAGTC TTG	Amplifizierung des native Promotors von <i>tin3</i> , führt eine NcoI Schnittstelle ein [R]
136	<i>3xHA_ClaI_fw</i>	GATCATCGATGGCCAACGCGGCCTAC C	Amplifizierung des 3xHA Epitops, führt eine ClaI Schnittstelle ein [F]
137	<i>3xHA_XhoI_re</i>	GATCCTCGAGCGCGCCCTAATAGTCG GGCAC	Amplifizierung des 3xHA Epitops, führt eine XhoI Schnittstelle ein [R]
144	<i>atg8_RT_fw</i>	TGTCGGCCAGTTTGTCTATG	Für qPCR, amplifiziert <i>atg8</i> [F]
145	<i>atg8_RT_rev</i>	TCCTCGTCCTGTTCTCTTC	Für qPCR, amplifiziert <i>atg8</i> [R]
147	<i>tin3pep_HA_C_fw</i>	TGCCCGACTATGCCATCTACGATGAGC TTC	Inverse PCR zur Integration eines HA-Epitops in <i>tin3</i> (aa 99), enthält das 3'-Hälfte des HA-Epitops [F]
148	<i>tin3pep_HA_C_re</i>	CGTCGTAGGGGTATGGCTTCACTCTGA GGTG	Inverse PCR zur Integration eines HA-Epitops in <i>tin3</i> (aa 99), enthält das 5'-Hälfte des HA-Epitops [R]
149	<i>HA_tin3pep_N_fw</i>	GCCCGACTATGCCAACTCCCTCTTAT TCC	Inverse PCR zur Integration eines HA-Epitops in <i>tin3</i> (aa 21), enthält das 3'-Hälfte des

			HA-Epitops [F]
150	HA_ <i>tin3</i> pep_N_re	ACGTCGTAGGGGTACTCTCCAAAGAC GAGG	Inverse PCR zur Integration eines HA-Epitops in <i>tin3</i> (aa 21), enthält das 5'-Hälfte des HA-Epitops [R]
153	<i>epic1</i> _atg_Mut	GGGCAAACCATAGATGACATTCC	Mutagenese des Start-Codons der NcoI Schnittstelle vor dem <i>epic1</i> Signalpeptid [F]
154	<i>tin3</i> SP_atg_Mut	GGGCAAACCATAGATGAAGTGC	Mutagenese des Start-Codons der NcoI Schnittstelle (G5A) vor dem <i>tin3</i> Signalpeptid [F]
155	<i>pit2</i> _NcoI_fw	GATCCCATGGCACTGTTTCGCTCAGCC TTTG	Amplifizierung von <i>pit2</i> , führt NcoI Schnittstelle ein [F]
156	<i>pit2</i> _XbaI_rev	GATCTCTAGATTCCCAGATGACCACAT C	Amplifizierung von <i>pit2</i> , führt XbaI Schnittstelle ein [R]
157	<i>tin3</i> _Nterm_fw	CTGGCTAGCAAGTTCTATCG	Inverse PCR um die Aminosäuren 22-54 von <i>tin3</i> zu deletieren [F]
158	<i>tin3</i> _Nterm_re	CACTCCAAAGACGAGGGATGG	Inverse PCR um die Aminosäuren 22-54 von <i>tin3</i> zu deletieren [R]
161	<i>beclin1</i> _RT_fw	TAGAGGTTGAGTGGGATGAG	Für qPCR, amplifiziert <i>beclin1</i> [F]
162	<i>beclin1</i> _RT_re	TTCACGGGACCAAACAGTTC	Für qPCR, amplifiziert <i>beclin1</i> [R]
163	<i>atg9</i> _RT_fw	CCACCAGCAAGGGAAACATC	Für qPCR, amplifiziert <i>atg9</i> [F]
164	<i>atg9</i> _RT_re	TGCCCACCAATTGCTGTTAG	Für qPCR, amplifiziert <i>atg9</i> [R]
165	<i>atg12</i> _RT_fw	CGCCGATCCTGAAGCAATCC	Für qPCR, amplifiziert <i>atg12</i> [F]
166	<i>atg12</i> _RT_re	GCTTCCCATCAATTCCAAAG	Für qPCR, amplifiziert <i>atg12</i> [R]
-	<i>GAPDH-F</i>	CTTCGGCATTGTTGAGGGTTTG	Für qPCR, amplifiziert <i>gapdh</i> aus <i>Z. mays</i> ; erhalten von Nancy Stolle [F]
-	<i>GAPDH-R</i>	TCCTTGCTGAGGGTCCGTC	Für qPCR, amplifiziert <i>gapdh</i> aus <i>Z. mays</i> ; erhalten von Nancy Stolle [R]
-	<i>ppi-fw</i>	ACATCGTCAAGGCTATCG	Für qPCR, amplifiziert <i>ppi</i> aus <i>U. maydis</i> ; erhalten von Nancy Stolle [F]

-	<i>ppi-re</i>	AAAGAACACCGGACTTGG	Für qPCR, amplifiziert <i>ppi</i> aus <i>U. maydis</i> ; erhalten von Nancy Stolle [R]
-	T7	TAATACGACTCACTATAGGG	Sequenzierung, hybridisiert mit T7 Promotor; Eurofins (Ebersberg) [F]
-	T7 term	CTAGTTATTGCTCAGCGGT	Sequenzierung, hybridisiert mit T7 Terminator; Eurofins (Ebersberg) [R]
-	pGAD for	GGGATGTTTAATACCACTAC	Sequenzierung, hybridisiert mit pGADT7; Eurofins (Ebersberg) [F]
-	pGAD-rev	AAGAAATTGAGATGGTGAC	Sequenzierung, hybridisiert mit pGADT7; Eurofins (Ebersberg) [R]
-	pGBK-rev	TTTCGTTTTAAACCTAAGAGTC	Sequenzierung, hybridisiert mit pGBKT7; Eurofins (Ebersberg) [R]
-	11464 Comp RV_2	AATTTATCCTAGTTTGCGCG	Sequenzierung, hybridisiert mit 5'-Ende des <i>nos</i> -Terminators; erhalten von Nancy Stolle [R]
-	oDL110	GTGCCAGACTTTGTGTGTGCG	Sequenzierung, hybridisiert mit 3'-Ende des <i>otef</i> -Promotors; erhalten von Daniel Lanver [F]
-	M13-fw	GTAAAACGACGGCCAG	Sequenzierung, hybridisiert mit pCRII-TOPO; Eurofins (Ebersberg) [F]
-	M13-rev	CAGGAAACAGCTATGAC	Sequenzierung, hybridisiert mit pCRII-TOPO; Eurofins (Ebersberg) [R]

¹ Die Sequenz ist in 5' zu 3' Richtung angegeben; Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

² Das Oligonukleotid hybridisiert entweder mit dem *sense-Strang* [R] oder mit dem komplementären Strang [F] des jeweiligen Gens.

4.3.6 Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten und hergestellten Plasmide wurden durch Restriktionsanalysen überprüft. Durch PCR generierte Plasmidteile wurden des Weiteren mittels Sequenzierung (Eurofins MWG Operon, Ebersberg) auf ihre Korrektheit

untersucht. Soweit nicht anders vermerkt vermitteln die Plasmide eine Ampicillin-Resistenz.

Plasmide zur Klonierung von PCR- Produkten

pCRII-TOPO (Invitrogen, Karlsruhe)

Ein Plasmid zur Klonierung von PCR- Produkten mittels Topoisomerase-Aktivität. Das Plasmid kann für die Blau-Weiß-Selektion verwendet werden.

pENTR 4 (Invitrogen, Karlsruhe)

Verwendet für die Klonierung von Genen für pEntry-Gatewayklonierungen. Die Gene wurden mit BspHI/NcoI-NotI geschnitten und in das NcoI-NotI linearisierte Plasmid ligiert. Das Plasmid vermittelt eine Kanamycin-Resistenz.

Plasmide zur Expression von Genen in *E. coli*

pPR-iBA1 (IBA, Göttingen)

Leervektor für die Expression von Genen in *E. coli*. Der Vektor enthält einen T7-Promotor und wird für die 3'-Ende Fusion von Genen an eine Sequenz, die für einen 3x-*Strep*-Tag codiert, verwendet.

pPR-iBA1 *tin3*-*Strep* (diese Arbeit)

Dieses Plasmid wurde generiert, um Tin3 ohne Signalpeptid in *E. coli* zu produzieren. Hierbei wurde *tin3* mit den Oligonukleotiden 38 und 39 amplifiziert und mit pPR-iBA1 ligiert. Dabei wurde *tin3* am 3'-Ende mit einer Sequenz fusioniert, die für einen 3x - *Strep*-Tag codiert. Mittels Inverser PCR mit den Oligonukleotiden 74 und 75 wurde hinter dem ersten *Strep*-Tag ein Stop-Codon eingefügt.

pPR-iBA1 *mir3*-*Strep* (diese Arbeit)

Dieses Plasmid wurde generiert, um Mir3 ohne Signalpeptid in *E. coli* zu produzieren. Hierbei

wurde *mir3* mit den Oligonukleotiden 40 und 41 amplifiziert und mit pPR-iBA1 ligiert. Dabei wurde *mir3* am 3'-Ende mit einer Sequenz fusioniert, die für einen 3x - *Strep*-Tag codiert.

Plasmide zur Generierung von stabilen *U. maydis* Mutanten

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit verwendeten Ausgangsplasmide sowie die selber hergestellten Plasmide beschrieben, die für die Gewinnung stabiler *U. maydis* Mutanten zum Einsatz kamen.

p123 (Aichinger *et al.*, 2003)

Enthält das *gfp*-Gen unter Kontrolle des *otef*-Promotors und des nos-Terminators. Das Plasmid kann nach Linearisierung im *ip*-Gen von *U. maydis* durch homologe Rekombination in den *ip*-Lokus integriert werden.

p123 *P_{otef}* *tin3*-HA (diese Arbeit)

Hergestellt für die konstitutive Expression von *tin3* in AB33 unter Kontrolle des *otef*-Promotors und des nos-Terminators. Das *tin3* NcoI/NotI Fragment wurde mit den Oligonukleotiden 3 und 37 amplifiziert und in das NcoI/NotI-geschnittene p123-Plasmid integriert, hierbei wurde das NcoI-Startcodon mit Oligonukleotid 154 mutiert. Mittels inverser PCR wurde ein HA-Epitop am 3'-Ende von *tin3* eingefügt. Das Plasmid kann mit SspI linearisiert und in den *ip*-Locus von *U. maydis* inseriert werden.

p123 *P_{tin3}* *tin3*_{Δ100-265} (diese Arbeit)

Hergestellt für die Komplementation des *tin3* Deletionsstamms (SG200Δ*tin3*). Der endogene Promotor von *tin3* wurde mit den Oligonukleotiden 35 und 135, *tin3*_{Δ100-265} mit den Oligonukleotiden 37 und 133 amplifiziert. In

einer 3-Fragment-Ligation wurden die beiden Fragmente in das NcoI/BamHI geschnittene p123-Plasmid integriert. Hierbei wurde anschließend das NcoI-Startcodon mit dem Oligonukleotid 154 mutiert. Das Plasmid kann mit AgeI linearisiert und in den *ip*-Locus von *U. maydis* inseriert werden.

p123 P_{tin3} *tin3*-HA (diese Arbeit)

Dieses Plasmid wurde hergestellt, um als Matrize für weitere Plasmide zu dienen. Der endogene Promotor von *tin3* wurde mit den Oligonukleotiden 35 und 135, *tin3*-HA mit den Oligonukleotiden 3 und 61 amplifiziert. Anschließend wurden die beiden Fragmente in einer 3-Fragment-Ligation in p123 integriert. Das NcoI-Startcodon wurde mit Oligonukleotid 154 mutiert.

p123 P_{tin3} *tin3*_{Δ55-99}-HA (diese Arbeit)

Hergestellt für die Komplementation des *tin3* Deletionsstamms (SG200Δ*tin3*). Die für die Aminosäuren 55-99 codierenden Basenpaare von *tin3* wurden mittels inverser PCR (Oligonukleotide 70 und 71) mit p123_ P_{tin3} _*tin3*-HA als Matrize deletiert. Das Plasmid kann mit AgeI linearisiert und in den *ip*-Locus von *U. maydis* inseriert werden.

pEX-A-*epic1* optimised (Invitrogen, Karlsruhe)

Dieses Plasmid enthält die für *U. maydis* Codon-optimierte Gensequenz, die für den Proteaseinhibitor EPIC1 von *P. infestans* codiert. Die Gensequenz kann durch NcoI/NotI Enzymverdau für die Integration in p123 verwendet werden.

p123 P_{tin3} *epic1*-HA (diese Arbeit)

Hergestellt für die Komplementation des *tin3* Deletionsstamms (SG200Δ*tin3*). Der ORF des

Proteaseinhibitor Gens *epic1* von *P. infestans* wurde durch NcoI/NotI Enzymverdau von pEX-A-*epic1* in p123 integriert. Der endogene Promotor von *tin3* wurde mit den Oligonukleotide 35 und 135 amplifiziert und in das vorher konstruierte Plasmid p123-*epic1* eingefügt, um den *otef*-Promotor auszutauschen. Zuletzt wurde das NcoI-Startcodon mit dem Oligonukleotid 154 mutiert. Das Plasmid kann mit AgeI linearisiert und in den *ip*-Locus von *U. maydis* inseriert werden.

p123 P_{tin3} *tin3*¹⁻²¹-HA-*tin3*²²⁻²⁶⁵-HA (diese Arbeit)

Hergestellt für die Expression von *tin3*¹⁻²¹-HA-*tin3*²²⁻²⁷⁶-HA in *U. maydis* unter Kontrolle des endogenen Promotors von *tin3*. Mittels inverser PCR (Oligonukleotide 149 und 150) mit p123_ P_{tin3} _*tin3*-HA als Matrize wurde ein internes HA-Epitop direkt hinter dem Signalpeptid von *tin3* (aa21) eingefügt. Das Plasmid kann mit AgeI linearisiert und in den *ip*-Locus von *U. maydis* inseriert werden.

p123 P_{tin3} *tin3*¹⁻⁹⁹-HA-*tin3*¹⁰⁰⁻²⁶⁵-HA (diese Arbeit)

Hergestellt für die Expression von *tin3*¹⁻⁹⁹-HA-*tin3*¹⁰⁰⁻²⁶⁵-HA in *U. maydis* unter Kontrolle des endogenen Promotors von *tin3*. Mittels inverser PCR (Oligonukleotide 147 und 148) mit p123_ P_{tin3} _*tin3*-HA als Matrize wurde ein internes HA-Epitop in *tin3* (aa99) eingefügt. Das Plasmid kann mit AgeI linearisiert und in den *ip*-Locus von *U. maydis* inseriert werden.

p123 P_{tin3} *pit2*-HA (diese Arbeit)

Hergestellt für die Komplementation des *tin3* Deletionsstamms (SG200Δ*tin3*). Der ORF des *U. maydis* Effektors *pit2* wurde mit den Oligonukleotide 155 und 156 amplifiziert und in p123_ P_{tin3} _*epic1*-HA (wobei die NcoI

Schnittstelle nicht mutiert war) integriert. Das Plasmid kann mit AgeI linearisiert und in den *ip*-Locus von *U. maydis* inseriert werden.

p123 *P_{tin3}* *tin3*Δ_{22-54, 100-265} (diese Arbeit)

Hergestellt für die Komplementation des *tin3* Deletionsstamms (SG200Δ*tin3*). Die für die Aminosäuren 22-54 codierenden Basenpaare wurden mittels inverser PCR (Oligonukleotide 157 und 158) mit p123_*P_{tin3}*_*tin3*Δ₁₀₀₋₂₆₅ als Matrize deletiert. Das Plasmid kann mit AgeI linearisiert und in den *ip*-Locus von *U. maydis* inseriert werden.

Plasmide für *S. cerevisiae*

pGBKT7

(Clontech, Saint-Germain-en-Laye/Frankreich)

Dieses Plasmid enthält die GAL4-Bindedomäne gefolgt von einem myc-Epitop. Es wurde für die Herstellung von N-terminalen GAL4BD-myc-Fusionen mit verschiedenen im Hefe Zwei-Hybrid-System zu testenden Genen verwendet (Köderplasmid). Das Plasmid vermittelt eine Kanamycin-Resistenz und enthält den TRP1 Auxotrophiemarker.

pGBKT7-GW

(von Dr. Armin Djamei zur Verfügung gestellt)

Dieses Plasmid ist ein Destinationsvektor für Gatewayklonierungen zur Expression von Genen im Hefe Zwei-Hybrid-System. Dabei codiert es für die GAL4-Bindedomäne gefolgt von einem myc-Epitop. Es wurde für die Herstellung von N-terminalen GAL4BD-myc-Fusionen mit verschiedenen im Hefe Zwei-Hybrid-System zu testenden Genen verwendet (Köderplasmid). Das Plasmid vermittelt eine Kanamycin-Resistenz und enthält den TRP1 Auxotrophiemarker.

pGADT7

(Clontech, Saint-Germain-en-Laye/Frankreich)

Dieses Plasmid enthält die GAL4-Aktivierungsdomäne gefolgt von einem HA-Epitop. Es wurde für die Herstellung von N-terminalen GAL4AD-HA-Fusionen mit verschiedenen im Hefe Zwei-Hybrid-System zu testenden Genen verwendet (Beutegene). Das Plasmid enthält den LEU2 Auxotrophiemarker.

pGBKT7-*tin3*Δ₁₋₂₁

(von Thomas Brefort zur Verfügung gestellt)

Enthält das *U. maydis tin3* Gen ohne Signalpeptid fusioniert an die GAL4-Bindedomäne. Dieses Plasmid wurde für Hefe Zwei-Hybrid-Analysen eingesetzt.

pGBKT7-*tin3*Δ_{1-54, 100-265} (diese Arbeit)

Hergestellt für die Expression von *tin3*Δ_{1-54, 100-265} im Hefe Zwei-Hybrid-System. Die für die Aminosäuren 55-99 codierenden Basenpaare wurde mit den Oligonukleotide 88 und 89 amplifiziert und zuerst in das pEntry Plasmid integriert. Anschließend wurde *tin3*⁵⁵⁻⁹⁹ mittels Gatewayklonierung in pGBKT7-GW überführt. Damit wurde *tin3*⁵⁵⁻⁹⁹ mit der GAL4-Bindedomäne fusioniert.

pGBKT7-*tin3*Δ₅₅₋₉₉ (diese Arbeit)

Hergestellt für die Expression von *tin3*Δ₅₅₋₉₉ im Hefe Zwei-Hybrid-System. Die für die Aminosäuren 55-99 codierenden Basenpaare wurden mittels inverser PCR mit den Oligonukleotide 70 und 71 deletiert, wobei pGBKT7-*tin3*Δ₁₋₂₁ als Matrize verwendet wurde. Dabei wurde *tin3*Δ₅₅₋₉₉ an die GAL4-Bindedomäne fusioniert.

pGADT7-*arf1* (diese Arbeit)

Hergestellt für die Expression von *arf1* im Hefe Zwei-Hybrid-System. Für die Amplifikation von *arf1* wurden die Oligonukleotide 42 und 43

verwendet. Dabei wurde *arf1* an die GAL4-Aktivierungsdomäne fusioniert.

pGADT7-*suf4* (diese Arbeit)

Hergestellt für die Expression von *suf4* im Hefe Zwei-Hybrid-System. Für die Amplifikation von *suf4* wurden die Oligonukleotide 44 und 45 verwendet. Dabei wurde *suf4* an die GAL4-Aktivierungsdomäne fusioniert.

pGADT7-*beclin1* (diese Arbeit)

Hergestellt für die Expression von *beclin1* im Hefe Zwei-Hybrid-System. Für die Amplifikation von *beclin1* wurden die Oligonukleotide 46 und 47 verwendet. Dabei wurde *beclin1* an die GAL4-Aktivierungsdomäne fusioniert.

pGADT7-*mir3* Δ_{1-26} (diese Arbeit)

Hergestellt für die Expression von *mir3* Δ_{1-26} ohne Signalpeptid im Hefe Zwei-Hybrid-System. Für die Amplifikation von *mir3* Δ_{1-26} wurden die Oligonukleotide 5 und 15 verwendet. Dabei wurde *mir3* Δ_{1-26} an die GAL4-Aktivierungsdomäne fusioniert.

pGADT7-*mir3*^{C157G, H293D} (diese Arbeit)

Hergestellt für die Expression von *mir3*^{C157G, H293D} im Hefe Zwei-Hybrid-System. Die Substitutionen von C157G und H293D in *mir3* Δ_{1-26} wurden mittels QuickChange Site-Directed-Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla/USA) unter Verwendung der Oligonukleotide 64 und 65 durchgeführt, wobei pGADT7-*mir3* Δ_{1-26} als Matrize für die Mutagenese PCR dient. Dabei wird *mir3*^{C157G, H293D} an die GAL4-Aktivierungsdomäne fusioniert.

pGADT7-*zm66281* Δ_{1-28} (diese Arbeit)

Hergestellt für die Expression von *zm66281* Δ_{1-28} ohne Signalpeptid im Hefe Zwei-Hybrid-System. Für die Amplifikation von *zm66281* Δ_{1-28} wurden die Oligonukleotide 5 und 15 verwendet. Dabei

wurde *zm66281* Δ_{1-28} an die GAL4-Aktivierungsdomäne fusioniert.

pGADT7-*cp1a* Δ_{1-23}

(von André Müller zur Verfügung gestellt)

Verwendet für die Expression von *cp1a* Δ_{1-23} ohne Signalpeptid im Hefe Zwei-Hybrid-System. Dabei wurde *cp1a* Δ_{1-23} an die GAL4-Aktivierungsdomäne fusioniert.

pGADT7-*cp1b*

(von André Müller zur Verfügung gestellt)

Verwendet für die Expression von *cp1b* ohne Signalpeptid im Hefe Zwei-Hybrid-System. Dabei wurde *cp1b* an die GAL4-Aktivierungsdomäne fusioniert.

pGADT7-*cp2*

(von André Müller zur Verfügung gestellt)

Verwendet für die Expression von *cp2* ohne Signalpeptid im Hefe Zwei-Hybrid-System. Dabei wurde *cp2* an die GAL4-Aktivierungsdomäne fusioniert.

pGADT7-*xcp2*

(von André Müller zur Verfügung gestellt)

Verwendet für die Expression von *xcp2* ohne Signalpeptid im Hefe Zwei-Hybrid-System. Dabei wurde *xcp2* an die GAL4-Aktivierungsdomäne fusioniert.

pGADT7-*cathepsin b*

(von André Müller zur Verfügung gestellt)

Verwendet für die Expression von *cathepsin b* ohne Signalpeptid im Hefe Zwei-Hybrid-System. Dabei wurde *cathepsin b* an die GAL4-Aktivierungsdomäne fusioniert.

pVTU₂₆₀ (Euroscarf, Frankfurt)

Dieses Plasmid enthält den *ADHI* Promotor und wurde sowohl als Kontrollplasmid als auch als Ausgangsplasmid für die Expression von Genen

in *S. cerevisiae* verwendet. Integrierte Gene werden dabei am 5'-Ende mit einem his-Epitop fusioniert. Das Plasmid enthält den *URA3* Auxotrophiemarker.

pGADT7-GW-3xHA (diese Arbeit)

Dieses Plasmid ist ein Destinationsvektor für Gatewayklonierungen zur Expression von Genen in *S. cerevisiae*. Der Gatewayvektor pGADT7-GW-Cterm-betactamasefragment $\frac{1}{2}$ wurde freundlicherweise von Dr. Armin Djamei zur Verfügung gestellt und diente als Ausgangsplasmid. Dieses Plasmid wurde mit ClaI/XhoI geschnitten. Das 3xHA Epitop wurde mit den Oligonukleotiden 136 und 137 amplifiziert und ebenfalls mit ClaI/XhoI geschnitten. Anstelle des Betalaktamasefragments wird das 3xHA Epitop in das Plasmid eingebracht. Das Plasmid wurde für die Herstellung von C-terminalen 3xHA-Fusionen mit *tin3*⁵⁵⁻⁹⁹ und *tin3* Δ_{1-22} verwendet und enthält den *leu2-d* Auxotrophiemarker.

pVTU₂₆₀-beclin1 (diese Arbeit)

Hergestellt für die Expression von *beclin1* in *S. cerevisiae*. *beclin1* wurde mit den Oligonukleotiden 106 und 107 amplifiziert und mit den Enzymen SpeI/BspHI geschnitten. pVTU₂₆₀ wurde mit den kompatiblen Enzymen NheI/NcoI geschnitten und mit dem *beclin1* Fragment ligiert. Damit wurde *beclin1* am 5'-Ende mit dem his-Epitop fusioniert und steht unter der Kontrolle des *ADHI*-Promotors.

pGADT7-*tin*²²⁻⁹⁹ (diese Arbeit)

Hergestellt für die Expression von *tin3*²²⁻⁹⁹ in *S. cerevisiae*. *tin3*²²⁻⁹⁹ wurde mit den Oligonukleotiden 34 und 89 amplifiziert, mit den Enzymen NcoI/NotI geschnitten und zunächst in das pEntry Plasmid kloniert. Anschließend wurde *tin3*²²⁻⁹⁹ mittels Gatewayklonierung in pGADT7-

GW-3xHA überführt. Damit wurde *tin3*²²⁻⁹⁹ am 3'-Ende mit dem 3xHA-Epitop fusioniert und steht unter der Kontrolle des *ADHI*-Promotors.

pGADT7-*tin3* Δ_{1-21} (diese Arbeit)

Hergestellt für die Expression von *tin3* Δ_{1-21} in *S. cerevisiae*. *tin3* Δ_{1-21} wurde mit den Oligonukleotiden 34 und 51 amplifiziert, mit den Enzymen NcoI/NotI geschnitten und zunächst in das pEntry Plasmid kloniert. Anschließend wurde *tin3* Δ_{1-21} mittels Gatewayklonierung in pGADT7-GW-3xHA überführt. Damit wurde *tin3* Δ_{1-21} am 3'-Ende mit dem 3xHA-Epitop fusioniert und steht unter der Kontrolle des *ADHI*-Promotors.

Plasmide zur transienten Transformation von *N. benthamiana*

pBIN19AN

(von Dr. Armin Djamei zur Verfügung gestellt)

Dieses Plasmid enthält den 35S Promotor und wurde als Ausgangsplasmid für die Expression von Genen in *N. benthamiana* verwendet. Integrierte Gene werden dabei am 5'-Ende mit einem IgG-Epitop fusioniert, welches durch eine Prescission Protease Schnittstelle abgetrennt werden kann. Das Plasmid vermittelt eine Kanamycin Resistenz für die Selektion in *E. coli* und *A. tumefaciens*.

pBIN19AN *mir3* strep IgG (diese Arbeit)

Herstellung für die Expression von *mir3* in *N. benthamiana* durch die transiente Transformation mit *A. tumefaciens*. *mir3-Strep* wurde mit den Oligonukleotiden 100 und 130 amplifiziert und über PspOMI und NotI Schnittstellen in pBIN19AN integriert. Dabei wurde *mir3* am 3'-Ende mit einem IgG-Epitop fusioniert.

pBIN19AN *mir3* $\Delta_{368-449}$ strep IgG (diese Arbeit)

Herstellung für die Expression von *mir3* $\Delta_{368-449}$ in *N. benthamiana* durch die transiente Transformation mit *A. tumefaciens*. *mir3* $\Delta_{368-449}$ -*Strep* wurde mit den Oligonukleotiden 100 und 131 amplifiziert und über PspOMI und NotI Schnittstellen in pBIN19AN integriert. Dabei wurde *mir3* $\Delta_{368-449}$ am 3'-Ende mit einem IgG-Epitop fusioniert.

pBIN19AN *cp1A* *strep* IgG

(von Liang Liang zur Verfügung gestellt)

Verwendung für die Expression von *cp1A* in *N. benthamiana* durch die transiente Transformation mit *A. tumefaciens*. Dabei wurde *cp1A*-*strep* am 3'-Ende mit einem IgG-Epitop fusioniert.

Plasmide zur Expression von Genen in *P. pastoris*

pPICZ α A (Invitrogen, Karlsruhe)

Verwendung für die Expression von Genen in *P. pastoris*. Dabei stehen die Gene unter der Kontrolle des Methanol-induzierbaren AOX1-Promotors. Für die Sekretion von Proteinen in das Kulturmedium enthält das Plasmid eine Sequenz, die für das alpha-Sekretionssignal aus *S.*

cerevisiae codiert. Des Weiteren werden die inserierten Gene am 3'-Ende mit einem 1x myc-Epitop und einem 6x his-Epitop fusioniert.

pPICZ α A *tin3* Δ_{1-21} (diese Arbeit)

Hergestellt für die Expression von *tin3* Δ_{1-21} in *P. pastoris*. *tin3* Δ_{1-21} wurde mit den Oligonukleotiden 3 und 4 amplifiziert und mit pPICZ α A ligiert. Dabei wurde *tin3* Δ_{1-21} mit der Sequenz fusioniert, die für das alpha-Sekretionssignal aus *S. cerevisiae* codiert.

pPICZ α A *mir3* Δ_{1-21} (diese Arbeit)

Hergestellt für die Expression von *mir3* Δ_{1-21} in *P. pastoris*. *mir3* Δ_{1-21} wurde mit den Oligonukleotiden 5 und 18 amplifiziert und mit pPICZ α A ligiert. Dabei wurde *mir3* Δ_{1-21} mit der Sequenz fusioniert, die für das alpha-Sekretionssignal aus *S. cerevisiae* codiert.

4.4 Mikrobiologische Methoden

4.4.1 *E. coli* und *A. tumefaciens*

4.4.1.1 Rubidium-Chlorid-vermittelte Transformation von *E. coli*

Das vorliegende Protokoll wurde nach Cohen *et al.* (1972) modifiziert. Zur Herstellung transformationskompetenter Bakterienzellen wurden 100 ml dYT-Medium mit 10 mM MgCl₂ und 10 mM MgSO₄ versetzt und anschließend mit 1 ml einer frischen TOP10 Übernachtskultur angeimpft und die Kultur bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bei 37°C und 200 Upm inkubiert. Die Zellen wurden geerntet (3.000 Upm, 15 min, -4°C; Heraeus Varifuge 3.0R) und in 33 ml eiskalter RF1-Lösung resuspendiert. Nach 30 bis 60 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut abzentrifugiert (3.000 Upm, 15 min, -4°C; Heraeus Varifuge

3.0R), in 5 ml eiskalter RF2-Lösung resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde zu je 50 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

RF1-Lösung

100 mM RbCl
50 mM MnCl₂ x 4H₂O
30 mM K-Acetat
10 mM CaCl₂ x 2H₂O
15 % (v/v) Glycerin
in H₂O_{bid.}; pH 5,8 (mit Acetat); sterilfiltriert

RF2-Lösung

10 mM MOPS
10 mM RbCl
75 mM CaCl₂ x 2H₂O
15 % (v/v) Glycerin
in H₂O_{bid.}; pH 5,8 (mit NaOH); sterilfiltriert

Zur Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, jeweils 50 µl mit bis zu 10 µl Plasmidlösung (1-5 ng Plasmid) bzw. Ligationsansatz versetzt und 15 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (1 min bei 42°C) wurde der Transformationsansatz zur phänotypischen Expression der durch das eingebrachte Plasmid vermittelten Antibiotikaresistenz mit 800 µl dYT- Medium versetzt und 30-60 min bei 800 Upm und 37°C in einem Eppendorf-Wärmeblock inkubiert. Der Transformationsansatz wurde auf selektiven dYT-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.4.1.2 Transformation durch Elektroporation

Die Transformation durch Elektroporation wurde für *A. tumefaciens* verwendet. Eine frische Übernachtskultur wurde 1:100 in 500 ml dYT-Medium verdünnt und bei 28°C und 200 Upm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7 inkubiert. Die Zellen wurden dann für 15 - 30 min auf 0°C heruntergekühlt und anschließend abzentrifugiert (300 Upm, 15 min, 4°C, Heraeus Varifuge 3.0R). Das Pellet wurde in 500 ml kaltem Wasser resuspendiert, abzentrifugiert, erneut in kaltem Wasser (250 ml) resuspendiert und wieder pelletiert. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml kaltem 10 %-igem Glycerin resuspendiert, abzentrifugiert und schließlich in 0,5 bis 1 ml kaltem 10 %-igem Glycerin aufgenommen. Die transformationskompetenten Zellen wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

Zur Transformation wurden die elektrokompenten Zellen langsam auf Eis aufgetaut. 50 µl Zellsuspension wurden mit bis zu 10 µl entsalzter DNA gemischt und 1 min auf Eis inkubiert. Der Transformationsansatz wurde daraufhin in eine vorgekühlte 0,2 cm breite Elektroporationsküvette überführt und die Küvette in die vorgesehene Halterung des Gen Pulsers gestellt (Gene Pulser, BioRad). Direkt danach wurde der Puls ausgelöst (25 mF; 200 W; 1,6 kV). Die Entladungszeit sollte zwischen 4 und 5 msec liegen. Im Anschluss an die Entladung wurde sofort 1 ml dYT-Medium in den Transformationsansatz pipettiert. Die Zellen wurden zur Regeneration 60 min bei 28°C inkubiert und anschließend auf selektiven Platten ausgestrichen.

4.4.1.3 Blau-Weiß-Selektion von *E. coli* Transformanten

Die Blau-Weiß-Selektion ist eine Methode zur visuellen Erkennung von korrekt inserierten Konstrukten in Plasmide (beispielsweise pCR-TOPO2.1 und II). Hierbei resultiert die Insertion in einer Unterbrechung des *lacZ*-Gens, so dass keine funktionelle β -Galactosidase produziert wird, die X-Gal in einen blauen Indigofarbstoff spaltet. Kolonien, in denen Plasmide mit Insert enthalten sind, bleiben somit auf X-Gal-haltigen Platten weiß und sind so leicht von den blauen Kolonien mit Vektoren ohne Insertion des gewünschten Konstrukts zu unterscheiden.

4.4.1.4 Gateway-Klonierung

Das Gatewaysystem ist eine *in vitro* Klonierungsstrategie, die auf dem Rekombinationssystem des Phagen Lambda beruht. Ein zu untersuchendes Gen kann mit dieser Methode in eine Vielzahl verschiedener Zielplasmide eingebracht werden, ohne klassische Restriktions- und Ligationsreaktionen durchzuführen. Das zu klonierende Gen wurde zunächst durch klassische NcoI/BspHI-NotI Restriktion und Ligation in den transkriptionell inaktiven pEntry-Vektor eingebracht. In diesem Plasmid ist das Gen von attL-Rekombinationssequenzen flankiert. Das Zielplasmid trägt spezifische kompatible Rekombinationsseiten (attR). Durch Zugabe des LR-Clonase®II-Enzymmixes, welcher die λ -Integrase (eine Tyrosin-Rekombinase), den „Integration Host Faktor“ (IHF) und das Excisionsprotein Xis beinhaltet, kann eine gezielte Rekombination zwischen den att-Sequenzen stattfinden und das Gen gerichtet in den Destinationsvektor eingebracht werden. Das Gatewaysystem besitzt zwei Selektionsmechanismen, einerseits eine klassische Antibiotika-Resistenz und andererseits eine Gegenselektion mittels des *ccdB*-Genprodukts. CcdB inhibiert die bakterielle Gyrase und führt zum Zelltod von *E. coli*

TOP10 oder DH5 α Zellen. Mit Hilfe dieser Selektionsmarker können Zellen, welche das rekombinierte Zielplasmid aufgenommen haben, von Zellen mit dem Entryklon sowie dem Nebenprodukt und dem nicht rekombinierten Zielplasmid getrennt werden.

Die Gateway-Reaktion wurde wie folgt durchgeführt:

0,5 μ l Zielplasmid (150 ng/ μ l)

1 μ l Entry-Vektor (50-150 ng)

0,5 μ l TE-Puffer pH 7,5

0,5 μ l LR-Clonase® II Enzymmix

Es fand eine Inkubation von 1 h statt. Anschließend wurden 0,25 μ l Proteinase K hinzugegeben, um die LR-Reaktion abzustellen und für 10 min bei 37 °C inkubiert. Der gesamte Ansatz wurde für die Transformation von kompetenten *E. coli* DH5 α -Zellen (40 μ l) verwendet.

4.4.2 *U. maydis*, *S. cerevisiae* und *P. pastoris*

4.4.2.1 Transformation von *U. maydis*

U. maydis wurde nach einem nach Schulz *et al.* (1990) und Gillissen *et al.* (1992) modifizierten Protokoll transformiert. Eine frische YEPS_{light}-Startkultur wurde angesetzt und für 8-10 h bei 28°C geschüttelt. Diese wurde anschließend 1:300 in 50 ml frischem YEPS_{light}-Medium verdünnt und bei 28°C bis zu einer Zelldichte von $1-2 \times 10^7$ Zellen/ml (bis maximal OD_{600nm} = 1,0) geschüttelt. Zur Ernte wurden die Zellen bei 3200 Upm (10 min, RT, Heraeus Varifuge 3.0R) zentrifugiert, einmal mit 25 ml SCS gewaschen und in 2 ml SCS mit 2,5 mg/ml Novozym resuspendiert. Die so gestartete Protoplastierung wurde mikroskopisch verfolgt, da die zigarrenförmigen Zellen nach Lyse der Zellwand eine kugelige Form annehmen. Nachdem etwa 50 – 70 % der Zellen mit der Protoplastierung begonnen haben (5 - 15 min), wurden 10 ml SCS zugegeben und die Protoplasten durch 10-minütige Zentrifugation bei 2.300 Upm (4°C, Heraeus Varifuge 3.0R) pelletiert. Um das Novozym vollständig zu entfernen, wurde dieser Waschschrift dreimal wiederholt. Anschließend wurden die Zellen einmal mit 10 ml STC gewaschen und das Pellet danach in einem Volumen von 0,5 ml eiskaltem STC aufgenommen. Die so behandelten Protoplasten wurden direkt transformiert oder aliquotiert bei -80°C mehrere Monate aufbewahrt. Zur integrativen Transformation wurden 70 μ l Protoplasten mit max. 20 μ l linearisierter DNA (bis zu 5 μ g) und 1 μ l Heparin-Lösung (10 mg/ml) für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 0,5 ml STC/PEG folgte eine weitere Inkubation von 15 min

auf Eis. Anschließend wurde der gesamte Transformationsansatz auf einer kurz zuvor mit 12 ml Top-Agar überschichteten Regenerationsagarplatte ausgestrichen, die das entsprechende 2x konzentrierte Antibiotikum in 12 ml Bottom-Agar enthält. Nach 2 bis 5 Tagen Inkubation bei 28°C wurden die gewachsenen Kolonien mit Zahnstochern auf Antibiotikum-haltigen PD-Platten vereinzelt. Potenzielle Transformanten wurden mittels Southern-Blot Analyse verifiziert.

SCS-Lösung

20 mM Na-Citrat, pH 5,8
1 M Sorbitol
in H₂O_{bid.}, sterilfiltriert

STC-Lösung

10 mM Tris-Cl, pH 7,5
100 mM CaCl₂
1 M Sorbitol
in H₂O_{bid.}, sterilfiltriert

STC/PEG-Lösung

15 ml STC
10 g PEG4000

Regenerations-Agar (Schulz *et al.*, 1990)

Top:
1,5 % (w/v) Bacto-Agar
1 M Sorbitol
in Yeps_{light}
Bottom:
wie Top, zusätzlich doppelt konzentriertes Antibiotikum

4.4.2.2 Transformation von *S. cerevisiae*

Die PEG-vermittelte Transformation von *S. cerevisiae* Stämmen erfolgte wie in der Anleitung des „Matchmaker Two-Hybrid System 3“ von Clontech (LaJolla/USA) beschrieben.

4.4.2.3 Transformation von *P. pastoris*

P. pastoris Stämme wurden mit der Elektroporationsmethode, wie in „EasySelect Pichia Expression Kit“ Anleitung (http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/easyselect_man.pdf) beschrieben, transformiert.

4.5 Molekularbiologische Methoden

4.5.1 *In vitro* Modifikationen von Nukleinsäuren

4.5.1.1 Restriktionen

Restriktionen von DNA wurden mittels Typ II Restriktionsendonukleasen (NEB, Frankfurt) für 1 - 16 h bei enzymespezifischer Temperatur durchgeführt. Die Menge an eingesetzter DNA variierte dabei zwischen 0,5 µg und 2 µg. Ein typischer Restriktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

X µl DNA (0,5 - 5 µg)
5 µl enzymespezifischer 10 x NEB-Puffer
5 µl 10 x BSA (NEB)
1 U Restriktionsendonuklease
ad 50 µl H₂O_{bid.}

4.5.1.2 Ligation von DNA Fragmenten

Zur Ligation von DNA-Fragmenten wurde T4 DNA Ligase (Roche, Mannheim) eingesetzt. In Ligationen, bei denen ein linearisierter Vektor mit einem DNA-Fragment verbunden werden sollte, wurde die entsprechende DNA im molaren Verhältnis von 1:5 eingesetzt. In Ligationen, bei denen drei Fragmente zu einem linearen DNA-Molekül ligiert werden sollten, wurde ein molares Verhältnis von 1:1:1 eingesetzt. In der Regel wurden die Ligationen in 20 - 50 µl Ansätzen mit 1 U T4 DNA Ligase über Nacht bei 16°C durchgeführt. Die insgesamt eingesetzte Menge an DNA variierte dabei zwischen 100 ng und 2 µg.

4.5.1.3 Polymerase Kettenreaktion

Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verwendet. Je nach Anwendung wurden verschiedene Polymerasen eingesetzt. Die Herstellung von Plasmiden erfolgte mittels Phusion Polymerase, während die Taq-Polymerase für Test-PCRs benutzt wurde.

Im Folgenden sind typische Ansätze für die einzelnen Polymerasen beschrieben. Außerdem wird das PCR Programm nach folgendem Schema dargestellt: Initiale Denaturierung - [Denaturierung - Anlagerung - Elongation] x Zahl der Zyklen - finale Elongation. Die Elongationszeiten wurden je nach Größe des zu amplifizierenden

Fragments und nach Synthesegeschwindigkeit der verwendeten Polymerase variiert. Die Anlagerungstemperatur der jeweils verwendeten Oligonukleotide wurde mittels des Programms Clonemanager 9 (Sci-Ed Software, Cary/USA) bestimmt. Die PCR-Reaktionen wurden in einer PCR-Maschine (TPersonal Thermocycler, Biometra) durchgeführt.

PCR-Ansatz mit Phusion-Polymerase

(Finnzymes/NEB, Frankfurt)

Ansatz ca. 50 µg Matrizen-DNA

200 µM dNTPS (1:1:1:1 Verhältnis)

1 µM Oligonukleotid 1 (bindet am 5' Strang)

1 µM Oligonukleotid 2 (bindet am 3' Strang)

1 x konzentrierter HF- oder GC-Puffer (Finnzymes)

0,5 U Phusion-Polymerase

Programm: 98°C/30 s – [98°C/30 s – 55-74°C/15 s – 72°C/10s/kb] x 30-40 – 72°C/10 min

PCR-Ansatz mit Taq-Polymerase

(Fermentas, St. Leon-Roth)

Ansatz etwa 50 µg Matrizen-DNA

250 µM dNTPS (1:1:1:1 Verhältnis)

1 µM Oligonukleotid 1

1 µM Oligonukleotid 2

1 x konzentrierter Taq Puffer mit (NH₄)₂SO₄ (Fermentas)

1,5 mM MgCl₂

1 U Taq-DNA-Polymerase

Programm: 95°C/3 min - [95°C/30 sec - 55-65°C/30 sec - 72°C/1 min/kb] x 35 - 72°C/10 min

PCR-Ansatz mit RedMix

(Bioline, Luckenwalde)

Ansatz 1 x konzentrierter RedMix

1,25 µM Oligonukleotid 1 (bindet am 5' Strang)

1,25 µM Oligonukleotid 2 (bindet am 3' Strang)

1 µl Zellkultur bzw. 1 Kolonie (Pilze oder Bakterien)

Programm: 94°C/2 min – [94°C/30 s – 50-65°C/20 s – 72°C/30 s/kb] x 30-40 – 72°C/10 min

4.5.1.4 Ortspezifische Mutagenese von Nukleinsäuren

Nukleinsäuremutagenesen zum gezielten Austausch von einzelnen oder wenigen Basen in Plasmiden mittels PCR mit bis zu drei Oligonukleotiden, die die gewünschten Mutationen enthielten, wurden mit dem „QuikChange (Multi) Kit“ (Stratagene, LaJolla/USA) nach Herstellerangaben durchgeführt.

4.5.2 Isolierung von Nukleinsäuren

4.5.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Plasmid-DNA, die später für Sequenzierungen verwendet werden sollte, wurde mit Hilfe des QIAprep Mini Plasmid Kits nach Herstellerangaben isoliert. Für andere Anwendungen, wie beispielsweise Restriktionsanalysen, wurde Plasmid-DNA nach dem Prinzip der kochenden Lyse (Sambrook *et al.*, 1989) extrahiert. Dazu wurden 1,5 ml einer *E. coli* Übernachtskultur pelletiert (13.000 Upm, Heraeus Biofuge 15). Dem Zellpellet wurden 350 µl STET und 25 µl Lysozym-Lösung zugeführt, die Proben auf einem Vibrax-VXR Schüttler (IKA, Staufen) für 1 min geschüttelt und anschließend 1 min bei 95°C in einem Eppendorf-Wärmeblock inkubiert. Die lysierten Zellen und die denaturierte genomische DNA wurden 10 min bei 13.000 Upm abzentrifugiert (Heraeus Biofuge 15) und anschließend mit einem sterilen Zahnstocher aus der wässrigen Lösung entfernt. Die Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 35 µl 3 M Na-Acetat (pH 5,3) und 420 µl Isopropanol für 5 min gefällt und abzentrifugiert (13.000 Upm, 5 min; Heraeus Biofuge 15). Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, 5 min an der Luft getrocknet und in 100 µl TE-Puffer mit 20 µg/ml RNase A aufgenommen. Mit dieser Methode gelang es routinemäßig, aus 1,5 ml Übernachtskultur etwa 50 µg Plasmid-DNA zu isolieren.

STET-Puffer

50 mM Tris-HCl, pH 8,0
50 mM Na₂-EDTA
8 % (w/v) Saccharose
5 % (v/v) Triton X-100
in H₂O_{bid.}

Lysozym-Lösung

10 mM Tris-HCl, pH 8,0
10 mg/ml Lysozym
in H₂O_{bid.}

TE-Puffer

1 mM Na₂-EDTA
10 mM Tris-HCl, pH 8,0

4.5.2.2 Isolierung von genomischer DNA aus *U. maydis*

Diese Methode wurde nach Hoffman *et al.* (1987) modifiziert. 1,5 ml einer Übernachtskultur in YEPS_{light} wurden zusammen mit 0,3 g Glasperlen in einem 2 ml

Eppendorf-Reaktionsgefäß pelletiert (13.000 Upm, 3 min; Heraeus Biofuge 15), der Überstand verworfen und das Pellet in 500 µl *Ustilago*-Lysepuffer und 500 µl TE Phenol/Chloroform aufgenommen. Die Proben wurden für 15 min auf einem Vibrax-VXR Schüttler (IKA, Staufen) geschüttelt und anschließend 15 min zentrifugiert (13.000 Upm; Heraeus Biofuge 15). Nach der Phasentrennung wurden 400 µl des Überstands in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und mit 1 ml Ethanol gefällt. Nach Zentrifugation (13.000 Upm, 10 min; Heraeus Biofuge 15) wurde das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen, für 5 min an der Luft getrocknet und in 50 µl TE mit 20 µg/ml RNase A aufgenommen. Die Resuspendierung erfolgte bei 55°C für etwa 15 min auf einem Eppendorf-Wärmeblock.

***Ustilago*-Lysepuffer**

50 mM Na₂-EDTA

1 % (w/v) SDS

in 50 mM Tris-HCl, pH 7,5

TE-Phenol/Chloroform

Mischung aus gleichen Teilen Phenol (mit TE-Puffer äquilibriert) und Chloroform

4.5.2.3 Isolierung genomischer DNA aus infizierten Maispflanzen

Sieben Tage alte Maispflanzen wurden wie in Kapitel 4.7.1.1 beschrieben mit *U. maydis* infiziert. 30 Stunden bis zwölf Tage nach Infektion wurde das dritte Blatt präpariert und mit 0,1 % Tween20 gewaschen, um pilzliches Material von der Blattoberfläche zu entfernen. Als Ausgangsmaterial für die DNA-Isolierung wurden etwa 2 cm große Blattabschnitte unterhalb der Einstichlöcher verwendet und 10 solcher Blattabschnitte vereint. Diese Proben wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und mit einem Mörser zerkleinert. Das Material wurde anschließend in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 0,3 g Glasperlen, 500 µl *Ustilago*-Lysepuffer und 500 µl TE-Phenol/Chloroform versetzt. Alle weiteren Schritte erfolgten wie in Kapitel 4.5.2.2 beschrieben.

4.5.2.4 Isolierung von RNA aus infizierten Maispflanzen

Für die Extraktion von RNA aus mit *U. maydis* infiziertem Maisgewebe wurden infizierte Bereiche des 3. Blattes unterhalb der Einstichlöcher geerntet und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Blattstücke wurden anschließend zerkleinert, in Eppendorf-Gefäße überführt und mit einem Eppendorf-Mörser unter fortwährender Stickstoffkühlung pulverisiert. RNA wurde dann aus dem Pulver mittels der Trizol-Extraktionsmethode (Invitrogen, Karlsruhe) nach Herstellerangaben präpariert. Eine Qualitäts- und

Quantitätskontrolle erfolgte durch photometrische Messung am NanoDrop ND_1000 Spektrophotometer.

4.5.3 Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäuren

4.5.3.1 Agarose-Gelelektrophorese

Mittels Gelelektrophorese wurden Nukleinsäuren in einem elektrischen Feld größenspezifisch aufgetrennt. Hierbei wandert die DNA aufgrund ihrer negativen Ladung in Richtung Anode. Die Agarosekonzentration der verwendeten Gele variierte zwischen 0,8 % und 2,0 %. Zur Herstellung der Gele wurde die jeweilige Menge an Agarose in 1x TAE oder 0,5x TBE durch Aufkochen gelöst und mit Ethidiumbromid versetzt (Endkonzentration 0,25 µg/ml). Das Gel wurde in flüssigem Zustand etwa 1 cm hoch in eine Gelform (10 x 12 cm) gegossen, nach dem Erstarren in eine dafür vorgesehene Gelkammer transferiert und mit dem entsprechenden Puffer bedeckt. Die DNA wurde in Gelauftragspuffer aufgenommen, auf der Seite der Kathode auf das Gel aufgetragen und bei 80 - 150 mA aufgetrennt. Als Größenstandard wurde 1 kb ladder (0,5 - 10 kb; NEB, Frankfurt) oder 100 bp ladder (0,1 - 1,5 kb; NEB, Frankfurt) verwendet. Die DNA wurde durch UV-Bestrahlung bei 254 nm sichtbar gemacht. Die Dokumentation fand mit einer Geldokumentationsanlage (BioDoc-IT-System; UVP) statt.

5 x TBE-Puffer

440 mM Tris-Base
440 mM Borat
10 mM Na₂-EDTA
in H₂O_{bid.}

50 x TAE-Puffer

2 M Tris-Base
2 M Acetat
50 mM Na₂-EDTA
in H₂O_{bid.}

6 x Gelauftragspuffer (nicht-denaturierend)

50 % (w/v) Saccharose
0,01 % (w/v) Bromphenolblau
in TE-Puffer

4.5.3.2 Southern Analyse

Zunächst wurde die genomische DNA aus *U. maydis* Transformanten isoliert (siehe Kapitel 4.5.2.2) und etwa 5 µg der gewonnenen DNA mit Restriktionsendonukleasen geschnitten. Die Enzyme wurden dabei so gewählt, dass aufgrund des eingebrachten Konstrukts die Anzahl und Größe der entstandenen Fragmente in diesem Locus verändert war. Die restringierte DNA wurde anschließend mittels Gelelektrophorese aufgetrennt (TAE-Gel, 1% Agarose, 80 mA) und mit einer nach Southern (1975) modifizierten Methode auf eine Nylonmembran transferiert. Vor dem Transfer wurde das Gel für 20 - 30 min in 0,25 M HCl zur Depurinierung langsam schwenkend inkubiert. Dies ermöglichte auch den Transfer großer DNA-Fragmente. Anschließend wurde das Gel für 15 min in 0,4 M NaOH äquilibriert. Der Transfer auf eine Nylonmembran (Hybond-N+; GE Healthcare, München) erfolgte über Kapillarkräfte, indem die Transfer-Lösung (0,4 M NaOH) aus einem Pufferreservoir durch das Gel hindurch in einen Stapel Papierhandtücher gesaugt wurde. Die DNA-Fragmente werden dabei durch den Flüssigkeitsstrom aus dem Gel eluiert und binden an die darüber liegende Nylonmembran. Der Transfer erfolgte in der Regel über Nacht, mindestens jedoch für 5 h.

Zur Detektion der immobilisierten DNA-Fragmente wurden DNA-Sonden mittels PCR DIG Labelling Mix (Roche, Mannheim) nach Herstellerangaben hergestellt. Um die Integration in den *ip*-Locus nachzuweisen wurde ein 0,6 kb Fragment des *ip*-Gens (*sdh2*) benutzt. Die markierte Sonde wurde in 30 ml Hybridisierungspuffer aufgenommen und 10 min bei 98°C denaturiert. Nach halbstündiger Vorhybridisierung der Membran mit Southern-Hybridisierungspuffer bei 65°C (Hybaid Shake'n'Stack, Thermo Electron Corporation) in einer Hybridisierungsröhre wurde der Puffer entfernt und die in Southern-Hybridisierungspuffer gelöste, denaturierte Sonde hinzugegeben. Die Hybridisierung erfolgte für mindestens sechs Stunden drehend im Hybridisierungsöfen bei 65°C. Danach wurden die Membranen zweimal mit Southern Waschpuffer bei 65°C gewaschen. Die weiteren Schritte erfolgten bei Raumtemperatur. Nach einem Waschschrift mit DIG-Waschpuffer für 5 min wurden die Membranen für 30 min in DIG2-Puffer inkubiert. Dann wurden die Membranen für 30 min mit Antikörperlösung geschwenkt. Der Antikörper ist dabei kovalent an eine alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt. Um überschüssigen Antikörper von den Membranen zu entfernen, wurde zweimal für je 15 min mit DIG-Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden die Membranen für 5 min mit DIG3-Puffer äquilibriert, um den für die alkalische Phosphatase optimalen pH-Wert von 9,5 zu

erreichen. Deren Substrat CDP Star (Roche, Mannheim) wurde 1:100 in DIG3 verdünnt und für 5 min zu den Membranen gegeben. Danach wurden die Membranen in Plastikfolie eingeschlagen und für 15 min bei 37°C inkubiert. Dadurch kann die lichtproduzierende Reaktion aktiviert werden. Die Membranen wurden dann in eine neue Folie überführt und in eine Kassette mit Verstärkerfolie gelegt. Die Exposition des Filmes (Kodak X- Omaz XAR-5) erfolgte je nach Intensität des Lichtsignals für 1 bis 30 min durch Auflegung des Filmes auf die eingeschlagene Membran. Entwickelt wurden die Filme in einer Röntgenfilm-Entwicklermaschine (QX-60, Konica).

1 M Natriumphosphat-Puffer

Lösung I 1 M Na_2HPO_4 in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid.}}$

Lösung II 1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid.}}$

Lösung I und Lösung II in einem Verhältnis von etwa 4:1 mischen, pH 7,0

Southern-Hybridisierungspuffer

7 % (w/v) SDS in 0,5 M Natriumphosphat-Puffer, pH 7,0

Southern-Waschpuffer

1 % (w/v) SDS in 0,1 M Natriumphosphat-Puffer, pH 7,0

DIG1

0,1 M Maleinsäure, pH 7,5

0,15 M NaCl

DIG2

1 % (w/v) Milchpulver in DIG1

DIG3

0,1 M Maleinsäure, pH 9,5

0,1 M NaCl

0,05 M MgCl_2

DIG-Wasch

0,3 % (v/v) Tween20 in DIG1

CDP-Star-Lösung

100 µl CDP-Star (Roche, Mannheim) in 10 ml DIG3

4.5.3.3 Quantitative „real-time“ PCR

Für Expressionsanalysen aus infiziertem Blattmaterial wurde die gewonnene Gesamt-RNA (siehe Kapitel 4.5.2.4) zunächst mittels First-Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, St.

Leon- Roth) nach Herstellerangaben revers transkribiert. Dabei wurden etwa 3 µg aufgereinigte Gesamt-RNA eingesetzt. Die synthetisierte cDNA wurde mit RNase-freiem Wasser 1:10 verdünnt und bis zur Analyse bei -20°C gelagert. Der Reaktionsansatz wurde mittels Super Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG Kit (Invitrogen, Karlsruhe) und 1 µl der verdünnten cDNA bzw. 0,5 µg der isolierten genomischen DNA (vgl. Kapitel 4.5.2.3) nach Herstellerangaben hergestellt. Als Referenzfarbstoff wurde 0,5 µl einer 1 µM Fluorescein-Lösung (Bio-Rad, München) je 25 µl PCR-Ansatz verwendet. Die quantitative PCR erfolgte auf einem Bio-Rad-iCycler-System unter der Verwendung des Programms 95°C/2 min - [95°C/30 s - 62°C/30 s - 72°C/30 s] x 45. Die Spezifität der Amplifikation wurde anhand einer Schmelzkurve am Bio-Rad-iCycler-System überprüft. Zur Kalkulation des CT (threshold cycle)-Wertes, der den Zyklus beschreibt, an dem die Fluoreszenz zum ersten Mal signifikant über die Hintergrundfluoreszenz steigt, wurde die Bio-Rad-Software Version 3.0a verwendet. Die Berechnung der relativen Werte erfolgte mit dem Programm Bio-Rad Gene Expression Macro.

Folgende Oligonukleotid-Paare wurden für die qPCR-Analysen eingesetzt: 126/127 (*tin3*) *ppi-fw/ppi-re* (*ppi*), *GAPDH-F/GAPDH-R* (*GAPDH* aus Mais), 161/162 (*beclin1* aus Mais), 144/145 (*atg8* aus Mais), 163/164 (*atg9* aus Mais) und 165/166 (*atg12* aus Mais). Die *tin3* Expression wurde relativ zur *ppi*-Expression (*um03726.2*) dargestellt, während die Expression der Autophagie-Gene, relativ zur *GAPDH*-Expression, gemessen wurde. Zur Bestimmung der pilzlichen Biomasse in infizierten Maispflanzen wurde das Verhältnis von Pilz-DNA (*ppi*) zu Pflanzen-DNA (*GAPDH*) gebildet. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt und die Werte gemittelt.

4.6 Biochemische Methoden

4.6.1 Gewinnung von Proteinextrakten

4.6.1.1 Gewinnung von denaturierten Proteinen aus *S. cerevisiae*

S. cerevisiae wurde in Flüssigmedium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 angezogen und 4 ml dieser Kultur wurden pelletiert (3.500 Upm, 5 min; Heraeus Variofuge 3.0R). Das Zellpellet wurde einmal mit 50 mM Tris-HCl (pH 6,8) gewaschen, anschließend mit SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 99°C erhitzt (Eppendorf-Wärmeblock, 800 Upm). Nach dem Abzentrifugieren der Proben (13.000 Upm, 1 min; Heraeus Biofuge 15) wurden

5 - 15 µl des Überstandes für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) eingesetzt.

SDS-Probenpuffer

5 % (w/v) SDS

50 % (v/v) Glycerin

0,05 % (w/v) Bromphenolblau

0,25 M (w/v) Dithiothreitol (kurz vor Verwendung)

in 0,225 M Tris-HCl, pH 6,8

4.6.1.2 Gewinnung von denaturierten Proteinen aus AB33 Filamenten

U. maydis AB33 Stämme wurden über Nacht in AM-MM angezogen, am Morgen auf eine OD₆₀₀ von 0,1 verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit sterilem H₂O_{bid.} gewaschen und in NM-MM resuspendiert. Die Induktion wurde für mindestens 4 - 6 Stunden unter aerober Inkubation bei 28°C durchgeführt. Die Filamentinduktion wurde mittels Lichtmikroskopie überprüft. 50 ml dieser Kultur wurden pelletiert (8.000 Upm, 10 min; Heraeus Variofuge 3.0R), in SDS-Probenpuffer resuspendiert und für 10 min bei 95°C erhitzt (Eppendorf-Wärmeblock, 800 Upm). Nach Zugabe von 0,3 g Glasperlen wurden die Proben mittels eines FastPrep-24 Homogenisators (6,5 m/s; MP Biomedicals, Heidelberg) 1 min aufgeschlossen. Der Überstand der *U. maydis* Kultur wurde gefiltert und mit 10 % (v/v) TCA versetzt. Die Proteine wurden über Nacht bei 4°C auf Eis präzipitiert und nach Zentrifugation (8500 Upm, 30 min, 4°C; Heraeus Biofuge stratos) in SDS-Probenpuffer aufgenommen.

Nach dem Erhitzen von Zellpellet und Überstand (5 min, 95°C, 800 Upm) wurden die Proben abzentrifugiert (13.000 Upm, 1 min; Heraeus Biofuge 15) und 5 - 15 µl des Überstandes für die SDS-PAGE und die weitere Analyse durch Western-Blot eingesetzt.

4.6.1.3 Gewinnung von Proteinextrakten aus *Z. mays*

Für die Herstellung von Proteinextrakten wurden Maispflanzen der Varietät Early Golden Bantam mit Wildtyp- und Deletionsstämmen infiziert. 2 - 5 Tage nach Infektion wurden infizierte Pflanzenteile geerntet und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Pflanzengewebe wurde zerkleinert und in flüssigem Stickstoff sorgfältig zu einem feinen Pulver gemörsert. Mörser und Pistill wurden mit flüssigem Stickstoff vorgekühlt. Das gefrorene Pflanzenpulver wurde in 1 ml Portionen in 2 ml Eppendorf-Cups überführt und das gefrorene Material anschließend auf Eis angetaut. Das angetaute Material wurde mit Extraktionspuffer auf 2 ml aufgefüllt und Zelltrümmer für 30 min bei 4°C und 13.000 Upm

in der Tischzentrifuge pelletiert. Der bräunliche Überstand wurde durch einen 35 µm Nylon-Filter (BD Biosciences, Heidelberg) von verbliebenem unlöslichem Material befreit und für weitere Anwendungen wie etwa die Anti-HA Immunpräzipitation (vgl. 4.6.4) oder Protease-Aktivitätstests (vgl. 4.6.5.2) genutzt.

Extraktionspuffer

100 mM NaCl

5 mM EDTA

5 mM EGTA

0,1 % (v/v) Triton-X100

1 mM β-Mercaptoethanol

10 % (v/v) Glycerin

0,3 % (v/v) Proteaseinhibitor Cocktail for plants (Roch, Mannheim)

in 100 mM Tris-HCl, pH 7.5

4.6.1.4 Gewinnung von apoplastischer Flüssigkeit aus *Z. mays***Salicylsäure-Infiltration von Maisblättern**

Dieser Versuch wurde durchgeführt, um die Proteaseaktivität in apoplastischer Flüssigkeit von Salicylsäure-infiltrierten Maisblättern zu bestimmen und die Inhibitor Funktion von *Tin3* zu beurteilen. Hierfür wurde ausschließlich das dritte Blatt von sieben Tage alten Maispflanzen mit Salicylsäure infiltriert. Aufgrund der schlechten Löslichkeit in Wasser, wurde die Salicylsäure (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) zunächst in 100 % EtOH gelöst (200 mM Stocklösung) und anschließend 1:100 mit H₂O_{bid.} verdünnt. Danach wurden die Pflanzen in Zusammenarbeit mit André Müller mit einer 2 mM Salicylsäure-Lösung infiltriert. Dazu wurde an der Blattunterseite mit einer 1 ml Spritze ohne Nadel unter leichtem Druck die Flüssigkeit ins Blatt gedrückt. Die infiltrierten Stellen wurden markiert, sodass nur diese Stellen für die Analyse verwendet wurden.

Isolation und Fraktionierung der apoplastischen Flüssigkeit (in Zusammenarbeit mit André Müller)

Die infiltrierten Blattbereiche wurden mit gerader Schnittkante horizontal abgeschnitten und sofort in Eiswasser gegeben. Anschließend wurde das Blattmaterial in einer Vakuumkammer 3 - 5 Mal für je 15 min bei 400 mbar, unter H₂O_{bid.} evakuiert. Die evakuierten Blattabschnitte wurden gestapelt und mit der Schnittkante nach unten vorsichtig in eine 50 ml Spritze geschoben. Um die Apoplastenflüssigkeit aus den Maisblättern zu drücken wurde die Spritze mit der kleinen Öffnung nach unten in ein 50 ml Falcon-Gefäß gegeben und für 15 min bei 3000 g und 4°C zentrifugiert. Auf diese

Weise erhält man aus circa 300 Töpfen mit je 4 Maispflanzen bis zu 10 ml Flüssigkeit, welche bei -20°C gelagert wurde. Zur Fraktionierung mittels Anionenaustauschchromatographie wurde die apoplastische Flüssigkeit auf Eis aufgetaut und der Proteingehalt mittels Bradford-Analyse (vgl. 4.6.3.1) bestimmt. Pro Lauf wurden 5 mg Protein der Apoplastenflüssigkeit auf eine mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer pH 6,0 äquilibrierte 1 ml MonoQ-Resin-Säule (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) gegeben. Die Säule wurde 2 Mal mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer pH 6,0 gewaschen. Der Durchfluss sowie die Waschschrte wurden in Fraktionen zu je 1 ml gesammelt. Anschließend erfolgte die Elution der Proteine in einem linearen NaCl Gradienten von 0 bis 1 M NaCl in 20 mM Natriumphosphat-Puffer pH 6,0. Die Eluate wurden jeweils in 500 µl Fraktionen in einem Gesamtvolumen von 20 ml gesammelt. Anschließend wurde die Säule mit 5 ml eines Natriumphosphat-Puffers pH 6,0 und 1 M NaCl gewaschen und die Waschschrte in 1 ml Fraktionen aufgefangen. Die einzelnen Fraktionen wurden anschließend für Protease-Aktivitätstests verwendet (vgl. 4.6.5.3).

4.6.1.5 Gewinnung von Proteinextrakten aus *N. benthamiana*

Protein-Rohextrakte aus transformierten *N. benthamiana* Blättern, für die heterologe Expression und Affinitätschromatographie von Proteinen, wurden durch mechanische Extraktion gewonnen. Hierzu wurden 4 - 6 *A. tumefaciens*-infiltrierte Tabakblätter nach 4-5 Tagen geerntet und in flüssigem Stickstoff mit Hilfe eines Mörsers zerkleinert. Das entstandene Pulver wurde mit 4 ml BPI-Puffer versetzt und gut gemischt. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurde das Pflanzen-Extrakt 30 min bei 8.500 Upm zentrifugiert, um grobe Pflanzenbruchstücke aus der Probe zu entfernen. Der Überstand wurde anschließend durch einen 35 µm Nylon-Filter (BD Biosciences, Heidelberg) völlig von Pflanzenteilen befreit. Das entstandene homogene Proteinextrakt wurde weiterhin für die Reinigung von Proteinen mittels Affinitätschromatographie verwendet (vgl. 4.6.2.4). Für die spätere SDS-PAGE und Western-Blot Analyse wurde eine Probe entnommen, mit SDS-Probenpuffer versetzt und für 10 min bei 99°C gekocht. Nach 1 min Zentrifugation bei 13.000 Upm wurde der entstandene Überstand für die Analysen verwendet.

BPI-Puffer

100 mM NaCl

5 mM EDTA

5 mM EGTA

0,1 % (v/v) Triton-X100

1 mM β -Mercaptoethanol
10 % (v/v) Glycerin
1 mM Benzamidin
1 mM 1-10 Phenanthrolin
1,5 μ M Aprotinin
in 100 mM Tris-HCl, pH 7.5

4.6.2 Heterologe Proteinexpression und Reinigung

4.6.2.1 Heterologe Expression und Reinigung von Tin3 in *E. coli*

Für funktionelle Analysen, wie zum Beispiel *in vitro* Protease-Assays, wurde Tin3 heterolog in *E. coli* BL21 (DE3) Rossetta exprimiert und anschließend über eine *Strep*-Tag Affinitätschromatographie gereinigt. Zur Expression wurde das Plasmid pPR-iBA-101_Tin3-strep in den entsprechenden *E. coli* Expressionsstamm transformiert und bei 37°C angezogen. Die Induktion der Genom-codierten T7-Polymerase erfolgte bei einer OD₆₀₀ von 1,0 mit 0,5 mM IPTG. Da in diesem Plasmid das Zielgen unter der Kontrolle des starken T7-Promotors steht, wird so die Proteinexpression induziert. Nach einer Induktionszeit von 20 Stunden bei 20°C wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet (8.000 Upm, 5 min; Heraeus Biofuge stratos) und bei -20°C gelagert.

Für die Affinitätschromatographie wurden die Zellpellets in BugBuster® Master Mix (Merck Chemicals, Darmstadt) resuspendiert und 20 min unter leichtem Schütteln inkubiert. Die aufgeschlossenen, unlöslichen Zelltrümmer wurden anschließend durch Zentrifugation (8.500 Upm, 30 min, 4°C; Heraeus Biofuge stratos) von der löslichen Proteinfraction getrennt, die anschließend für die Reinigung von Tin3 verwendet wurde. Zur Vorbereitung der Affinitätschromatographie wurden 500 μ l *Strep*-Tactin Sepharose (IBA, Göttingen) in Protein Säulen (Pierce/Thermo Scienific, Bonn) gegeben und mit 3x 10 ml Puffer W gewaschen. Die gewaschene *Strep*-Tactin Sepharose wurde mit 5 ml der löslichen Proteinfraction für 1 h bei 4°C drehend inkubiert. Eine Probe des Durchflusses wurde für die spätere Analyse mittels SDS-PAGE und Western-Blot entnommen. Es folgten 3 weitere Waschschrte mit jeweils 5 ml Puffer W, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen, auch hier wurde eine Probe der ersten Waschfraction entnommen. Die an die *Strep*-Tactin Sepharose gebundenen *Strep*-Fusionsproteine wurden anschließend in 3 Elutionsschritten mit jeweils 500 μ l Puffer E eluiert. Für SDS-PAGE und Western-Blot Analyse wurde eine Probe jeder Elutionsfraction sowie die zuvor entnommenen Durchfluss- und Waschfractionen mit SDS-Probenpuffer versetzt und für 10 min bei 99°C

gekocht. Die Elutionsfraktionen wurden nach einer Ankonzentration (vgl. 4.6.2.2) für die zusätzliche Aufreinigung mittels Ionenaustauschchromatographie verwendet (vgl. 4.6.2.3).

Puffer W

150 mM NaCl

1 mM EDTA

in 100 mM Tris-HCl, pH 8.0

Puffer E

150 mM NaCl

1 mM EDTA

2.5 mM Desthiobiotin

in 100 mM Tris-HCl, pH 8.0

4.6.2.2 Ankonzentration und Entsalzung von Proteineluaten

Die aufgereinigten Proteineluate (vgl. 4.6.2.1) wurden mit Hilfe von 3k Amicon Ultra-0.5 Zentrifugations-Filtereinheiten (Merck Millipore, Darmstadt) ankonzentriert (5 - 10fach), um das Volumen der Fraktionen einzugrenzen und die Proteinkonzentration zu erhöhen. Die Säulen führten gleichzeitig auch zu einer Entsalzung der Proben, die anschließend für die Ionenaustauschchromatographie (vgl. 4.6.2.3) verwendet wurden.

4.6.2.3 Ionenaustauschchromatographie

Die zusätzliche Aufreinigung der Tin3-*Strep* Elutionsfraktionen erfolgte mittels Ionenaustauschchromatographie durch eine SourceTM 15Q Anion Matrix (GE Healthcare, Freiburg). Zur Vorbereitung der Matrix wurden 300 µl der Beads 3 mal mit 600 µl des Startpuffers (0,1 M Natriumphosphat-Puffer, pH 6.0) gewaschen (1.500 Upm, 1 min; Heraeus Biofuge 15). Um die Matrix mit Gegenionen zu beladen folgte ein Waschschrift mit 600 µl 0,5 M NaCl, gefolgt von der Reequilibrierung der Matrix mit 0,02 M Natriumphosphat-Puffer pH 6.0. Die Bindung der Proteine (150 µl Proteineluat) an die Matrix erfolgte für 5 min bei 4°C, wobei der Durchfluss gesammelt wurde, da sich hier der größte Teil des Tin3-*Strep* Fusionsproteins befindet, der nicht an die Matrix gebunden hat. Der restliche, schwach gebundene Anteil des Tin3-*Strep* Proteins wurde durch einen Elutionsschritt mit 150 µl 0,05 M Natriumphosphat-Puffer pH 6,0 von der Matrix eluiert. Die Verunreinigungen konnten auf diese Weise entfernt werden, da diese in der Matrix gebunden bleiben.

4.6.2.4 Heterologe Expression und Reinigung von Mir3 und CP1A in *N. benthamiana*

Die Expression der Mais-Cysteinproteasen Mir3 und CP1A erfolgte in *N. benthamiana* mittels transienter *A. tumefaciens*-vermittelter Transformation. Hierzu wurden die Plasmide pBIN19AN_Mir3-strep-IgG und pBIN19AN_CP1A-strep-IgG für die Transformation von *A. tumefaciens* verwendet und in *N. benthamiana* Blätter infiltriert (vgl. 4.7.2.1). Pflanzenextrakte der infiltrierten Blätter wurden, wie in Kapitel 4.6.1.5 beschrieben, hergestellt und für eine zweifache Affinitätschromatographie verwendet. Für die IgG-Affinitätschromatographie wurden 500 µl Human IgG-Agarose (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) 3 Mal mit BPI Puffer gewaschen (vgl. 4.6.1.5) und anschließend mit 4 ml des Pflanzenextraktes für 2 - 4 h bei 4°C drehend inkubiert. Unspezifisch gebundene Proteine wurden durch zweimaliges Waschen mit Puffer BPI sowie einmal mit Puffer BP1I, von der Matrix entfernt. Es folgte die Abspaltung des IgG-Tags mit Hilfe der Precision Protease über Nacht bei 4°C (300 µl BP1I und 10 µl Precision Protease). Nach der Spaltung wurde der Überstand weiter über eine Strep-Tactin Affinitätschromatographie aufgereinigt, wie in Kapitel 4.6.2.1 beschrieben. Die Elutionsfraktionen wurden mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert sowie für weitere funktionelle Analysen verwendet. Für die *in vitro* Protease-Assays wurden die Proteasen durch Zugabe von 1 mM DTT und durch das Senken des pH-Wertes auf 5,0 aktiviert. Hierbei wird die Propeptid-Domäne der Proteasen abgespalten, die ansonsten die Protease Aktivität inhibiert.

BPII

50 mM HEPES, pH 7.0

150 mM NaCl

0,1 % (v/v) Triton-X100

1 mM DTT (immer frisch zugeben)

4.6.3 Auftrennung und Nachweis von Proteinen

4.6.3.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Quantifizierung löslicher Proteine in Proteinextrakten und Fraktionen gereinigter Proteine wurden mit Hilfe der Methode von Bradford (1976) durchgeführt. Als Eichprotein wurde Rinderserumalbumin (BSA) verwendet.

4.6.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteine wurden durch eine diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970) aufgetrennt. Bei dieser Methode wird den Proteinen durch Bindung an SDS eine konstant negative Ladung verliehen, was die Auftrennung in einem elektrischen Feld erlaubt. Die Gele setzten sich aus Sammelgel und Trenngel zusammen, wobei das Sammelgel der Konzentrierung der Proteine in einer Ebene vor dem Eintritt in das Trenngel dient. Im Trenngel werden die Proteine durch ein Polyacrylamidnetz nach ihrer Molekülgröße aufgetrennt. Die Molekülmasse der aufgetragenen Proteine wurde durch ein gefärbtes Proteinstandardgemisch (15 - 170 kD; Prestained Page Ruler; Fermentas, St. Leon-Roth) abgeschätzt. Vor Beginn wurden die Gelkammern (Mini Protean System; Bio-Rad, München) mit SDS-Laufpuffer gefüllt. Die Auftrennung erfolgte bei 50 mA/Gel.

6 x SDS-Gelladepuffer

1,5 mM Tris-HCl, pH 6,8

30 % (w/v) SDS

0,15 % (w/v) Bromphenolblau

10 % Endkonzentration Glycerin

SDS-Laufpuffer

25 mM Tris-HCl, pH 8,3

192 mM Glycin

4 mM SDS

4.6.3.3 Immunologischer Proteinnachweis durch Chemolumineszenz

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mittels Semi-dry Transfer System (Bio-Rad, München) auf eine PVDF-Membran (GE Healthcare, München) übertragen. Die Membran wurde vor der Verwendung durch Inkubation mit Methanol aktiviert. Es wurde eine Lage 3 mm Whatman-Papier in Transfer-Puffer befeuchtet und mit der PVDF-Membran bedeckt. Auf die Membran wurde blasenfrei das SDS-Gel gelegt und mit einem weiteren feuchten 3 mm Whatman-Papier bedeckt. Der Transfer erfolgte für 1 - 2 h bei 80 mA/Gel.

Western-Transfer-Puffer

192 mM Glycin

15 % (v/v) Methanol

in 25 mM Tris-HCl, pH 10,4

Für die immunologische Detektion der transferierten Proteine wurden spezifische Antikörper verwendet. Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind in Tabelle 8 aufgelistet. Die Membran wurde in der Blockierlösung für 1 h bei Raumtemperatur schwenkend inkubiert, kurz mit TBS-T gewaschen und dann bei 4°C im primären Antikörper über Nacht geschwenkt. Daraufhin wurde die Membran dreimal für 10 min mit TBS-T gewaschen und anschließend mit dem sekundären Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur schwenkend inkubiert. Zur Detektion wurden für die Western-Blot Analysen HRP (horse *raddish peroxidase*)-konjugierte sekundäre Antikörper verwendet. Nach drei weiteren Waschschritten mit TBS-T wurde die Chemolumineszenz-Reaktion durchgeführt, indem die Membran mit ECL-Reagenz (GE Healthcare, München) oder SuperSignal West Femto (Fisher Scientific, Schwerte) nach Herstellerangaben inkubiert wurde. Die Membran wurde in eine Plastikfolie transferiert und in eine Kassette mit Verstärkerfolie gelegt. Die Exposition des Filmes (Kodak X-Omaz XAR-5) erfolgte je nach Intensität des Lichtsignals für 30 s bis 30 min. Entwickelt wurden die Filme in einer Röntgenfilm-Entwicklermaschine (QX-60; Konica, München).

TBS-T

150 mM NaCl

0,1 % (v/v) Tween20

in 50 mM Tris-HCl, pH 7,5

Blockierlösung

5 % (w/v) Milchpulver in TBS-T

Antikörperlösung

Antikörper verdünnt in 3 % (w/v) Milchpulver in TBS

Tabelle 8: Verwendete Antikörper

Antikörper	Wirt	Verwendung¹	Bezug
anti-HA	Maus	Primärer Antikörper zur Detektion von HA-Fusionsproteinen in Western-Blot Analysen (1:10000)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
anti-c-Myc	Maus	Primärer Antikörper zur Detektion von Myc-Fusionsproteinen in Western-Blot Analysen (1:10000)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
anti-His	Maus	Primärer Antikörper zur Detektion von His-Fusionsproteinen in Western-Blot Analysen (1:10000)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Strep-Tactin HRP -	-	Strep-Tactin markiert mit Peroxidase zur Detektion von Strep-Fusionsproteinen in Western-Blot Analysen (1:2500). Strep-Tactin ist eine Streptavidin Variante, die speziell optimiert wurde um strep-Fusionsproteine	IBA GmbH (Göttingen)

		zu binden.	
anti-Maus-HRP	Pferd	Sekundärer Antikörper zur Detektion von primären Antikörpern die aus Mäusen gewonnen wurden, verwendet in Western-Blot Analysen (1:10000)	Cell Signaling Technology (Danver/USA)

¹ Die jeweiligen Antikörper-Verdünnungen sind in Klammern angegeben

4.6.3.4 Coomassie Proteinfärbung

Der Nachweis von Proteinen in SDS-Gelen erfolgte mittels Coomassie-Färbung (Nachweisgrenze: 200-400 ng Protein pro Bande). Zuerst wurden die Gele für 15 - 30 min in einer Coomassie-Maldi-Färbelösung (50 % (v/v) Methanol, 7 % (v/v) Essigsäure, 0,2 % (w/v) Brilliant Blau R250) schwenkend inkubiert. Die erste Entfernung ungebundenen Farbstoffs erfolgte durch 3 mal 15 min Inkubation in Entfärberlösung (40 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure). Zur vollständigen Entfärbung wurde das Gel über Nacht in Wasser inkubiert.

4.6.3.5 Silberfärbung

Diese sensitive Methode wurde zum sensitiven Nachweis von Proteinen in SDS-Gelen nach Blum *et al.* (1987) angewendet. Die Nachweisgrenze dieser Färbung beträgt 5 ng pro Bande.

4.6.4 Immunpräzipitation von HA-fusionierten Proteinen aus infiziertem Maisgewebe

Die Isolation von HA-Fusionsproteinen aus infiziertem Maisgewebe erfolgte durch Immunpräzipitation mit Hilfe des Pierce HA-Tag IP/Co-IP Kit (Pierce/Thermo Scientific, Bonn). Hierfür wurden Maispflanzen mit SG200, SG200 Δ tin3/HA-tin3-HA und SG200 Δ tin3/tin3₁₋₉₉-HA-tin3₁₀₀₋₂₆₅-HA infiziert und 2 Tage nach Infektion wie in Abschnitt 4.6.1.3 beschrieben extrahiert. Die Lysate aus je 10 infizierten Blättern wurden mit 20 μ l anti-HA Hochaffinitätsagarose (Pierce/Thermo Scientific, Bonn) versetzt und 3-12 Stunden drehend bei 4°C in Zentrifugationsröhrchen (Pierce/Thermo Scientific, Bonn) inkubiert. Als Positiv-Kontrolle diente aufgereinigtes HA-Fusionsprotein (Pierce/Thermo Scientific, Bonn). Nach der Inkubation wurde die Suspension über Sammelröhrchen (Pierce/Thermo Scientific, Bonn) aufgefangen, wobei der Durchfluss verworfen wurde. Nach fünfmaligem Waschen mit je 1 ml TBS-T wurden die an die anti-HA Matrix

gebundenen Proteine durch Zugabe von 25 µl nicht-reduzierenden IP-Probenpuffers (mit 0,25 M (w/v) Dithiothreitol) und durch 5-minütiges Kochen bei 99°C eluiert. Die Eluate wurden anschließend durch SDS-PAGE und Western-Blot analysiert.

5 x Nicht-reduzierender IP-Probenpuffer (Pierce)

0,3 M Tris /HCl, pH 6,8

5 % (w/v) SDS

50 % (v/v) Glycerin

„Pink lane marker tracking dye“

4.6.5 Protease-Aktivitätstests

4.6.5.1 *In vitro* Protease-Aktivitätstest

Der *in vitro* Protease-Aktivitätstest wurde mit 1 µM der aufgereinigten und aktivierten Mais-Cysteinproteasen Mir3 und CP1A durchgeführt, die durch die heterologe Expression in *N. benthamiana* (vgl. 4.6.2.4) gewonnen wurden. Als Substrat diente fluoreszierendes Z-Phe-Arg-7-amido-4-methylcoumarin (Z-Phe-Arg-AMC; Sigma-Aldrich, Steinheim), welches spezifisch durch Cysteinproteasen und bedingt auch durch Serinproteasen gespalten werden kann. Dabei kommt es zur Freisetzung einer fluoreszierenden Gruppe, deren Fluoreszenz bei 460 nm detektiert werden kann (Zimmerman *et al.*, 1976). Für den Assay wurde ein Gesamtvolumen von 200 µl eingesetzt, zusammengesetzt aus 1 µM aktivierter Protease, 100 µl 0,1 M Natriumphosphat-Puffer pH 6,0 und H₂O_{bid.} zum Auffüllen. Als Kontrollen wurden 10 µM Proteaseinhibitor E-64 (Sigma-Aldrich, Steinheim) oder 10 µM aufgereinigter *Strep*-Tag zugegeben. Die Quantifizierung der Inhibitor-Aktivität von Tin3 erfolgte durch 1 µM aufgereinigtes Tin3 Protein. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von 40 µl der 10 µM Substratlösung gestartet. Die Messung erfolgte in einem Fluorimeter (Tecan, Männedorf) über einen Zeitraum von 50 min.

4.6.5.2 Protease-Aktivitätstest in Proteinextrakten von infiziertem Mais

Dieser Protease-Aktivitätstest wurde mit Proteinextrakten aus Maisblättern durchgeführt, die zuvor mit SG200 oder der Deletionsmutante SG200Δ*tin3* infiziert wurden (vgl. 4.6.1.3). Die Proteinextrakte wurden nach Bradford-Messung auf 10 mg/ml eingestellt und mit 1 mM DTT versetzt, um die Aktivierung der Proteasen zu verbessern. Wie schon im *in vitro* Protease-Aktivitätstest (vgl. 4.6.5.1) beschrieben diente auch hier fluoreszierendes Z-

Phe-Arg-7-amido-4-methylcoumarin (Z-Phe-Arg-AMC; Sigma-Aldrich, Steinheim) als Substrat. Für den Assay wurde ein Gesamtvolumen von 200 μl eingesetzt, zusammengesetzt aus 50 μl der Proteinextrakte, 100 μl 0,1 M Natriumphosphat-Puffer pH 6,0 und $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid.}}$ zum Auffüllen. Als Kontrolle wurde 10 μM Proteaseinhibitor E-64 (Sigma-Aldrich, Steinheim) hinzugegeben. Die Quantifizierung der Inhibitor-Aktivität von Tin3 erfolgte durch 1 μM aufgereinigtes Tin3 Protein. Nach Zugabe des Substrates erfolgte die Messung in einem Fluorimeter (Tecan, Männedorf) über einen Zeitraum von 50 min.

4.6.5.3 Protease-Aktivitätstest in apoplastischer Flüssigkeit

Die Cysteinprotease-Aktivität der fraktionierten Apoplastenflüssigkeit (vgl. 4.6.1.4) wurde durch die Verwendung des fluoreszierenden Substrates Phe-Arg-7-amido-4-methylcoumarin (Z-Phe-Arg-AMC, Sigma-Aldrich, Steinheim) bestimmt. Durch die Aktivität der Proteasen kommt es zur Freisetzung einer fluoreszierende Gruppe, deren Fluoreszenz bei 460 nm detektiert werden kann (Zimmerman *et al.*, 1976). Zur Bestimmung der Proteaseaktivität in den einzelnen Fraktionen wurden 10 μl der jeweiligen Fraktion mit 80 μl Assaypuffer gemischt. Als Kontrolle wurde dem Puffer 5 μM E-64 (Sigma-Aldrich, Steinheim) oder 5 μM aufgereinigter *Strep*-Tag zugegeben. Die Inhibitor-Eigenschaften von Tin3 wurden durch die Zugabe von 5 μM Tin3 getestet. Nach 10 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch die Zugabe von 10 μl der 100 μM Substratlösung gestartet. Die Messung erfolgte in einem Fluorimeter (Tecan, Männedorf) über einen Zeitraum von 15 min. War die Proteaseaktivität zu hoch, wurden die Fraktionen zum Teil 1:10 verdünnt. Der Versuch wurde in Zusammenarbeit mit André Müller durchgeführt.

Assaypuffer

10 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 6,0
150 mM NaCl
1 mM EDTA
0,5 mM DTT

4.6.6 Assay zur Untersuchung der Proteolytischen Spaltung von Tin3 durch Mir3

Dieser Versuch wurde durchgeführt, um festzustellen ob Tin3 durch die Cysteinprotease Mir3 proteolytisch gespalten werden kann. Hierfür wurden die beiden aufgereinigten Proteine über einen Zeitraum von 30 min bei 30°C inkubiert. Die aktivierte Protease Mir3

wurde in einer Konzentration von 0,5 μM , Tin3 in einer Konzentration von 1 μM für den Assay eingesetzt. Als Kontrolle wurde Tin3 nur mit BPII-Puffer inkubiert, der schon für die Aufreinigung der Cysteinprotease verwendet wurde. Von beiden Ansätzen wurde jeweils nach 10 min, 20 min und 30 min eine Probe entnommen, die mit SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 99°C gekocht wurde. Die Spaltung von Tin3 wurde anschließend durch SDS-PAGE analysiert.

4.6.7 Assay zur Untersuchung einer möglichen Prozessierung von Tin3

Eine mögliche Prozessierung von Tin3 wurde durch Inkubation des aufgereinigten Tin3 Proteins (1 mg/ml) mit Pflanzenlysat von SG200-infizierten Maisblättern (2dpi; 1 mg/ml) oder mit Apoplastenflüssigkeit von SA-infiltrierten Maisblättern (1 mg/ml) untersucht. Zur Kontrolle wurden gereinigtes Tin3, Pflanzenlysat von SG200-infizierten Maisblättern und Apoplastenflüssigkeit von Salicylsäure-infiltrierten Maisblättern jeweils mit PBS-Puffer pH 7.0 inkubiert. Nach jeweils 20 min, 40 min und 60 min wurden Proben entnommen, die mit SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 99°C gekocht wurde. Die mögliche Prozessierung von Tin3 wurde anschließend durch SDS-PAGE analysiert.

4.6.8 Hefe Zwei-Hybrid-Systeme

Das Hefe Zwei-Hybrid-System wurde zur Charakterisierung von Interaktionen zwischen Tin3 und bereits bekannten Proteinen verwendet. Die Interaktionspartner von Tin3 wurden zuvor von Dr. Thomas Brefort in einer Analyse identifiziert, bei der Tin3 als Köderprotein fungierte. Als Bibliothek für die Suche nach Interaktionspartnern von Tin3 wurde eine cDNA-Bank aus infiziertem Pflanzenmaterial (2 und 5 dpi Gemisch) verwendet. Protein-Protein-Interaktionen wurden unter Hochstringenzbedingungen (Selektion auf SD –Leu –Trp –His –Ade) mit dem Matchmaker Yeast-Two-Hybrid-System II (MATCHMAKER Library Construction & Screening Kit, BD Biosciences Clontech, Saint-Germain-en-Laye) und dem Hefewirtstamm *S. cerevisiae* AH109 (Clontech, Saint-Germain-en-Laye) untersucht, bei dem die endogenen Gal4- und Gal80-Gene durch Deletionen inaktiviert sind.

4.6.9 Hefe-Autophagie-Assay

Der Hefe-Autophagie-Assay wurde verwendet, um die Funktion des Maisproteins Beclin1 als Autophagieprotein durch die Komplementation des homologen Hefeproteins Atg6 in einer Hefe-Deletionsmutante zu bestätigen. Des Weiteren konnte in diesem System der Einfluss von Tin3 auf die Bildung von Autophagosomen untersucht werden. Die *S. cerevisiae* Stämme wurden über Nacht in YEPD Medium angezogen, in SD(-N)-Medium überführt und auf eine OD₆₀₀ von 0,4 eingestellt. Anschließend wurden die Stämme in Anwesenheit von 1 mM PMSF für 4 h schüttelnd inkubiert. PMSF verhindert hierbei den Abbau von Autophagosomen in Vakuolen, um die Visualisierung und Auswertung zu ermöglichen. Das Vorhandensein von Autophagosomen in Hefezellen wurde mikroskopisch untersucht und ausgewertet.

4.7 Pflanzenmethoden

4.7.1 *Zea mays*

4.7.1.1 Infektionen von *Z. mays* mit *U. maydis*

Die Virulenz von *U. maydis* Stämmen wurde durch die Infektion von Maissetzlingen überprüft. Hierzu wurden Kulturen über Nacht in YEPS_{light} bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 angezogen und mit sterilem Wasser auf eine OD₆₀₀ von 1,0 eingestellt. Während der Infektion wurden 500 µl der Zellsuspension mit Hilfe einer Spritze in das Innere des Blattwirtels von sieben Tage alten Maispflanzen der Sorte Early Golden Bantam (Olds Seeds, Madison/USA) injiziert. Die Injektionsstelle wurde etwa 1 cm über der Erde gewählt, also etwa 2,5 bis 3 cm oberhalb des basalen Pflanzenmeristems. Dabei wurden in der Regel die Blattscheiden des ersten und des zweiten Blattes und die Blattspreiten des dritten und vierten Blattes durchstoßen. Die Pflanzen wurden in einem Gewächshaus bei 28°C (Tag) und 20°C (Nacht) kultiviert. Die Beleuchtung betrug im Laufe der Tag Phase mindestens 28.000 Lux (bei zusätzlicher Sonneneinstrahlung bis zu 90.000 Lux) und die relative Luftfeuchtigkeit lag zwischen 40 – 60 %.

Tabelle 9: Klassifizierung der Symptome von Maispflanzen nach Infektion mit *U. maydis*.

Pflanzensymptom	Beschreibung
Chlorosen	Pflanze zeigt gelblich-bleiche Verfärbungen an infizierten Blättern
Ligula Schwellung	Pflanze zeigt leichte Schwellungen der Ligula
Kleine Tumore	Die größten Tumore der Pflanze sind < 2 mm
Große Tumore	Die Tumore der Pflanze sind > 2 mm
Tumor-induzierte Krümmung der Sproßachse	Sehr starke Tumorbildung, die häufig mit einer Verkrümmung der Sprossachse einhergeht
Abgestorbene Pflanzen	Die Pflanze ist aufgrund der Infektion gestorben

Für die Quantifizierung von Pathogenitätssymptomen wurden zwölf Tage nach Infektion die Symptome je nach Stärke in sieben verschiedene Kategorien klassifiziert (Tabelle 9; modifiziert nach Kämper *et al.* (2006)). In der Regel wurden je Stamm drei unabhängige Infektionen mit 30 - 40 Pflanzen durchgeführt. Die Werte wurden anschließend gemittelt und prozentual zur Gesamtzahl der infizierten Pflanzen dargestellt.

4.7.2 *Nicotiana benthamiana*

4.7.2.1 Transiente *A. tumefaciens*-vermittelte Transformation von *N. benthamiana*

Für die *A. tumefaciens*-vermittelte transiente Expression von Proteinen in Tabakpflanzen wurde ausschließlich die Varietät *N. benthamiana* verwendet. Die Tabakpflanzen wurden in einem Gewächshaus wie für *Z. mays* beschrieben bei 28°C angezogen (vgl. 4.7.1.1). Zur Infektion von *N. benthamiana* mit *A. tumefaciens* wurden Stämme, die die gewünschten Plasmide enthielten, in dYT-Medium aerob angezogen und bei einer OD₆₀₀ von 0,2 mit 125 µM Acetosyringon (Sigma-Aldrich, Weinheim) versetzt. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,4 - 0,6 wurden die Zellen geerntet und in Induktionsmedium (125 µM Acetosyringon, 10 mM MgCl₂, 10 mM MES/KOH, pH 5,4) auf eine OD₆₀₀ von 1 gebracht. 3 - 6 Wochen alte Tabakpflanzen wurden mit einer 1 ml Plastikspritze ohne Nadel auf der Blattunterseite mit der Suspension infiltriert. Die infiltrierten Blattbereiche wurden 4 - 5 Tage nach der Infiltration geerntet und bei -80°C gelagert. Die Blätter wurden für die Gewinnung von Proteinextrakten aus *N. benthamiana* verwendet (vgl. 4.6.1.5).

4.8 Färbungen und Mikroskopie

4.8.1 Färbemethoden

4.8.1.1 Calcofluor-Färbung

Die Zellwand von *U. maydis* kann durch die Färbung mit Calcofluor white (CW; Fluorescent Brightener 28; Sigma-Aldrich, Deisenhofen) sichtbar gemacht werden. Diese Färbemethode wurde verwendet, um Hyphen und Appressorien von *U. maydis* auf der Pflanzenoberfläche sichtbar zu machen. Dazu wurde 30 h nach Infektion das 3. Blatt präpariert und ein 2 cm langes Stück unterhalb der Einstichlöcher ausgeschnitten. Das Blattfragment wurde für etwa 30 s in Calcofluor-Färbelösung inkubiert und nach dem Heraustrennen der Mittellamelle mit der Innenseite nach oben auf einen Objektträger gelegt und mikroskopiert.

Calcofluor-Stammlösung

10 mg/ml Fluorescent Brightener 28
in DMSO; Lagerung dunkel bei -20°C

Calcofluor-Färbelösung

1:100 Verdünnung der Stammlösung
in 0,2 M Tris-HCl, pH 8,0; Lagerung dunkel bei 4°C

4.8.1.2 Färbung mit WGA-Alexafluor 488 und Propidium-Iodid

Diese Methode diente der Visualisierung von Pilzhypen in infiziertem Maisgewebe (2 - 12 dpi). Hierbei färbt WGA-Alexafluor 488 die Pilzhypen, wohingegen Propidium Iodid (PI) Pflanzenzellwände färbt. Des Weiteren besitzt PI durch seine interkalierenden Eigenschaften auch Affinität zu DNA und ist nicht membrangängig, wodurch nur Zellkerne von abgestorbenen Zellen gefärbt werden können (Kroesen *et al.*, 1992). Blattproben der unterschiedlichen Zeitpunkte wurden für mindestens zwei Tage in Ethanol entfärbt. Dann wurden sie für 4 h in 10 % KOH bei 85°C inkubiert und die Proben anschließend mehrfach mit PBS gewaschen. Die Inkubation in der WGA-AF488/PI-Färbelösung erfolgte für 30 min; währenddessen wurden die Blätter 3 x 5 min bei 100 mbar vakuuminfiltiert (CVC 3000; Vacuubrand, Wertheim). Nach erfolgter Färbung wurden die Proben in PBS entfärbt und dunkel bei 4°C bis zur Analyse durch konfokale Laserscanning Mikroskopie gelagert.

PI-Stammlösung

10 mg/ml Propidium Iodid

in H₂O_{bid.}; Lagerung dunkel bei 4°C

WGA-AF488 Stammlösung

1 mg/ml WGA-Alexafluor 488

in H₂O_{bid.}; Lagerung dunkel bei 4°C

WGA-AF488/PI-Färbelösung

20 µg/ml Propidium Iodid

10 µg/ml WGA-Alexafluor 488

0,02 % Tween20

in PBS, pH 7,4

4.8.1.3 Färbung von Membranen mit FM4-64

Membranen von infiziertem Pflanzengewebe wurden modifiziert nach Kankanala *et al.* (2007) mit dem Farbstoff FM4-64 (Molecular Probes/Invitrogen, Karlsruhe) angefärbt. Dazu wurde der Farbstoff in Wasser auf eine Konzentration von 8 µM (Stocklösung: 1 mg/ml in DMSO) verdünnt. Um Membranen in infizierten Pflanzenblättern zu visualisieren, wurden Blattproben 30 h nach Infektion geerntet. Dazu wurde das 3. Blatt entfernt und ein 2 cm langes Stück ca. 1 cm unterhalb der Infektionsstelle ausgeschnitten und durch 3-malige Vakuuminfiltration bei 100 mbar (CVC 3000; Vacuubrand, Wertheim) in der Färbelösung infiltriert. Das gefärbte Blatt wurde anschließend durch konfokale Laserscanning Mikroskopie analysiert.

4.8.1.4 Färbung von Autophagosomen mit Monodansylcadaverin

Monodansylcadaverin (MDC; Biomol, Hamburg) ist eine autofluoreszierende Substanz, die verwendet wird, um Autophagie in Pflanzen zu detektieren. MDC ist eine schwache Base, die biologische Membranen passieren kann und sich in sauren Kompartimenten, wie Autophagosomen oder Endosomen, anreichert (Biederbick *et al.*, 1995). Für die Färbung wurden infizierte Maisblätter 30 h nach Infektion geerntet (2 cm des dritten Blattes 1 cm unter der Infektionsstelle) und durch 3-malige Vakuuminfiltration bei 100 mbar (CVC 3000; Vacuubrand, Wertheim) mit 0,5 mM MDC infiltriert. Das gefärbte Blatt wurde anschließend durch konfokale Laserscanning Mikroskopie analysiert.

4.8.1.5 Diaminobenzidinfärbung

Für Diaminobenzidin (DAB) - Färbungen wurden Blattspreiten infizierter Pflanzen (3. Blatt) in voller Länge geerntet und mit der Schnittfläche für 12 h in einer 1 mg / ml DAB Lösung inkubiert (RT/dunkel). Danach wurden die Blätter in einem Ethanol-Chloroform-Gemisch (4 : 1) bei 4°C entfärbt (2 - 3 Tage; dunkel) und mikroskopisch analysiert. Konserviert wurden die Präparate in 50 % Glycerol bei dunkler Lagerung (RT). Die gefärbten Blätter wurden im Durchlicht durch konfokale Laserscanning Mikroskopie analysiert.

4.8.1.6 Vorbereitung von Zellen aus axenischer Kultur für die Mikroskopie

Für die Mikroskopie von Zellen aus axenischer Kultur wurden Kulturen verwendet, die bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 - 0,8 gewachsen waren. Vor der Mikroskopie wurden die Objektträger mit einem Agarosekissen (2 % Agarose) versehen, auf das anschließend die Zellsuspension aufgetragen wurde. Dies führte dazu, dass die Zellen in ihrer Position fixiert wurden, was die Mikroskopie erleichterte.

4.8.2 Mikroskopie und Bildverarbeitung

Die zellmorphologischen Betrachtungen von *U. maydis* erfolgten vorwiegend an einem Lichtmikroskop (Axiophot, ZEISS) mittels Nomarski-Optik. Für DIC (differential interference contrast)-Mikroskopie wurde ein 40-, 63- und 100-faches Plan-Apochromat Objektiv (ZEISS) mit 1,4 numerischer Aperatur verwendet. Digitale Aufnahmen einer hochauflösenden CCD-Kamera (C4742, Hamamatsu) wurden mit den Programmen MetaMorph (Version 6.2r6) bearbeitet.

Für die konfokale Laserscanning Mikroskopie wurde ein TCS-SP5 (Leica, Bensheim) verwendet. Die Anregungs- und Emissionswellenlängen sowie die verwendeten Laser für die verschiedenen Anwendungen sind in Tabelle 10 dargestellt. Die Bildbearbeitung erfolgte mit der zugehörigen LEICA Software LAS AF (Leica application suite). Dabei wurden die zweidimensional abgerasterten Ebenen in einer Maximumprojektion übereinander gelegt.

Tabelle 10: Verwendete Laser und detektierte Emissionswellenlängen bei konfokaler Mikroskopie.

Laser	Anregungswellenlänge	Emissionswellenlänge	Detektion
Argon Laser	335	512 nm	MDC
Argon Laser	488	500 - 540 nm	AF488
DPSS Laser	561	580 - 660 nm	PI, FM4-64
405 Diode	405	415 - 460 nm	CW, Autofluoreszenz

4.9 Bioinformatische Methoden

Aminosäure- und Nukleotidsequenzen wurden den Datenbanken GenBank, dem „National Center of Biotechnology Information“ (NCBI; www.ncbi.nlm.nih.gov/), *S. cerevisiae* Genome Database (<http://yeastgenome.org/>) und MIPS *U. maydis* Database (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/ustilago/>) entnommen. Die von diesen Webseiten zur Verfügung gestellten BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; Altschul *et al.*, 1990; 1997)-Funktionen wurden zur Identifizierung von ähnlichen Protein- und Nukleotidsequenzen verwendet. Die virtuelle Klonierung von Plasmiden und die virtuelle Erstellung von Oligonukleotidsequenzen wurden mit dem Programm Clone Manager 9 (Scientific & Educational Software, New York) durchgeführt. Sequenzvergleiche von Aminosäure- und Nukleotidsequenzen erfolgte ebenfalls mit Clone Manager 9. Domänenanalysen wurden mit dem Programm SMART (Simple Modular Architecture Research Tool) durchgeführt (<http://smart.embl-heidelberg.de>). Proteine wurden mittels der Programme SignalP 4.0 (Nielsen *et al.*, 1997; Bendtsen *et al.*, 2004 ; www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/) und TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) auf eine N-terminale Signalsequenz bzw. anderweitige Lokalisierungssequenzen hin analysiert. Analyse und Vergleich von Proteasen erfolgte mit der MEROPS (the peptidase database)-Datenbank (Rawlings *et al.*, 2011 ; <http://merops.sanger.ac.uk/>).

5 Literatur

- Abramovitch, R.B., Kim, Y.J., Chen, S., Dickman, M.B. and Martin, G.B. (2003). *Pseudomonas* type III effector AvrPtoB induces plant disease susceptibility by inhibition of host programmed cell death. *EMBO* **22**, 60-69.
- Aichinger, C., Hansson, K., Eichhorn, H., Lessing, F., Mannhaupt, G., Mewes, W. and Kahmann, R. (2003). Identification of plant-regulated genes in *Ustilago maydis* by enhancer-trapping mutagenesis. *Mol. Genet. Genomics* **270**, 303-314.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403-410.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J.H., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389-3402.
- Apel, K. and Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**, 373-399.
- Ariki, S., Koori, K., Osaki, T., Motoyama, K., Inamori, K.I. and Kawabata, S.I. (2004). A serine protease zymogen functions as a pattern-recognition receptor for lipopolysaccharides. *PNAS USA* **101**, 953-958.
- Ausubel, F.M., Brenz, R., Kongston, R.E., Moore, D.D., Seidmann, J.G., Smith, J.A. and Strukl, K. (1987). Current protocols in molecular microbiology. *John Wiley & Sons, Inc., USA*.
- Baehrecke, E.H. (2005). Autophagy: dual roles in life and death? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 505-510.
- Baidez, A.G., Gomez, P., Del Rio, J.A. and Ortuno, A. (2007). Dysfunctionality of the xylem in *Olea europaea* L. plants associated with the infection process by *Verticillium dahliae* Kleb. Role of phenolic compounds in plant defense mechanism. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 3373-3377.
- Banuett, F. (2007) History of the mating types in *Ustilago maydis*. In *Sex in Fungi: Molecular Determination and Evolutionary Implications*. Washington, DC, ASM Press.
- Banuett, F. and Herskowitz, I. (1994). Morphological transitions in the life cycle of *Ustilago maydis* and their genetic control by the a and b loci. *Exp. Mycology* **18**, 247-266.
- Banuett, F. and Herskowitz, I. (1996). Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Development* **122**, 2965-2976.
- Bassham, D.C. (2007). Plant autophagy-more than a starvation response. *Curr. Opin. Plant Biol.* **10**, 587-593.
- Bauer, R., Oberwinkler, F. and Vánky, K. (1997). Ultrastructural markers and systematics in smut fungi and allied taxa. *Can. J. Bot.* **75**, 1273-1314.
- Bendtsen, J.D., Nielsen, H., von Heijne, G. and Brunak, S. (2004). Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.* **340**, 783-795.
- Biederbick, A., Kern, H.F. and Elsasser, H.P. (1995). Monodansylcadaverine (MDC) is a specific in vivo marker for autophagic vacuoles. *European J. Cell Biol.* **66**, 3-14.
- Birch, P.R.J., Rehmany, A.P., Prichard, L., Kamoun, S. and Beynon, J.L. (2006). Trafficking arms: oomycete effectors enter host plant cells. *Tr. Mikrobiol.* **14**, 8-11.
- Blum, H., Beier, H. and Gross, H.J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**, 93-99.
- Bohlmann, R. (1996). Isolierung und Charakterisierung von filamentspezifisch exprimierten Genen aus *Ustilago maydis*. *Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München*.
- Bölker, M., Urban, M. and Kahmann, R. (1992). The a mating type locus of *Ustilago maydis* specifies cell signaling component. *Cell* **68**, 441-450.
- Bowman, D.H. (1946). Sporidial fusion in *Ustilago maydis*. *J. Agric. Res.* **72**, 233-243.

- Brachmann, A., König, J., Julius, C. and Feldbrügge, M. (2004). A reverse genetic approach for generating gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Mol. Genet. Genomics* **272**, 216-226.
- Brachmann, A., Weinzierl, G., Kamper, J. and Kahmann, R. (2001). Identification of genes in the bW/bE regulatory cascade in *Ustilago maydis*. *Mol. Microbiol.* **42**, 1047-1063.
- Brachmann, C.B., Davies, A., Cost, G.J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P. and Boeke, J.D. (1998). Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* **14**, 115-132.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Brefort, T., Doehlemann, G., Mendoza-Mendoza, A., Reissmann, S., Djamei, A. and Kahmann, R. (2009). *Ustilago maydis* as a Pathogen. *Ann. Rev. Phytopathol.* **47**, 423-445.
- Broomfield, P.L.E. and Hargreaves, J.A. (1992). A single amino-acid change in the iron-sulphur protein subunit of succinate dehydrogenase confers resistance to carboxin in *Ustilago maydis*. *Curr. Genet.* **22**, 117-121.
- Cao, Y. and Klionsky, D.J. (2007). Physiological functions of Atg6/Beclin1: a unique autophagy-related protein. *Cell Res.* **17**, 839-849.
- Chisholm, S.T., Coaker, G., Day, B. and Staskawicz, B.J. (2006). Host-microbe interactions, shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* **124**, 803-814.
- Christensen, J.J. (1963). Corn smut induced by *Ustilago maydis*. *Amer. Phytopathol. Soc.* **2**.
- Cohen, S.N., Chang, A.C.Y. and Hsu, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *PNAS USA* **69**, 2110-&.
- Colombo, M.I., Gutierrez, M.G. and Romano, P.S. (2006). The two faces of autophagy: *Coxiella* und *Mycobacterium*. *Autophagy* **2**, 162-164.
- Dangl, J.L. (1995). Piece de Resistance: Novel Classes of Plant Disease Resistance Genes. *Cell* **80**, 363-366.
- Day, P.R. and Anagnostakis, S.L. (1973). The killer system in *Ustilago maydis*: Heterokaryon transfer and loss of determinants. *Phytopathol.* **63**, 1017-1018.
- de Haar, S.F., Jansen, D.C., Schoenmaker, T., De Vree, H., Everts, V. and Beertsen, W. (2004). Loss-of-function mutations in cathepsin C in two families with Papillon-Lefevre syndrome are associated with deficiency of serine proteinases in PMNs. *Human Mut.* **23**, 524-524.
- de Jonge, R., Bolton, M.D. and Thomma, B.P.H.J. (2011). How filamentous pathogens co-opt plants: the ins and outs of fungal effectors. *Curr. Opin. Plant Biol.* **14**, 400-406.
- de Wit, P.J.G.M. (2007). Visions & reflections (minireview) - How plants recognize pathogens and defend themselves. *Cell. Mol. Life Sci.* **64**, 2726-2732.
- Delgado, M.A., Elmaoued, R.A., Davis, A.S., Kyei, G. and Deretic, V. (2008). Toll-like receptors control autophagy. *EMBO* **27**, 1110-1121.
- Delgado, M.A., Singh, S., De Haro, S., Master, S., Ponpuak, M., Dinkins, C., et al. (2009). Autophagy and pattern recognition receptors in innate immunity. *Immunol. Rev.* **227**, 189-202.
- Djamei, A., Schipper, K., Rabe, F., Ghosh, A., Vincon, V., Kahnt, J., et al. (2011). Metabolic priming by a secreted fungal effector. *Nature* **478**, 395-399.
- Dodds, P.N. and Rathjen, J.P. (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nat. Rev. Genet.* **11**, 539-548.
- Doehlemann, G., van der Linde, K., Aßmann, D., Schwammbach, D., Hof, A., Mohanty, A., et al. (2009). Pep1, a secreted effector protein of *Ustilago maydis* is required for successful invasion of plant cells. *Plos Pathog.* **5**, e1000290.
- Doehlemann, G., Wahl, R., Horst, R.J., Voll, L.M., Usadel, B., Poree, F., et al. (2008a). Reprogramming a maize plant: transcriptional and metabolic changes induced by the fungal biotroph *Ustilago maydis*. *Plant J.* **56**, 181-195.

- Doehlemann, G., Wahl, R., Vranes, M., de Vries, R.P., Kämper, J. and Kahmann, R. (2008b). Establishment of compatibility in the *Ustilago maydis*/maize pathosystem. *J. Plant Physiol.* **165**, 29-40.
- Erez, E., Fass, D. and Bibi, E. (2009). How intramembrane proteases bury hydrolytic reactions in the membrane. *Nature* **459**, 371-378.
- Feldbrügge, M., Kämper, J., Steinberg, G. and Kahmann, R. (2004). Regulation of mating and pathogenic development in *Ustilago maydis*. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**, 666-672.
- Fryer, M.J., Oxborough, K., Mullineaux, P.M. and Baker, N.R. (2002). Imaging of photooxidative stress responses in leaves. *J. Exp. Bot.* **53**, 1249-1254.
- Gaffal, K.P., Friedrichs, G.J. and El-Gammal, S. (2007). Ultrastructural evidence for a dual function of the phloem and programmed cell death in the floral nectary of *Digitalis purpurea*. *Ann. Bot.* **99**, 593-607.
- Gillissen, B., Bergemann, J., Sandmann, C., Schroeer, B., Bolker, M. and Kahmann, R. (1992). A two-component regulatory system for self/non-self recognition in *Ustilago maydis*. *Cell* **68**, 647-657.
- Glazebrook, J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* **43**, 205-227.
- Grant, M. and Lamb, C. (2006a). Systemic immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* **9**, 414-420.
- Grant, S.G.N., Jessee, J., Bloom, F.R. and Hanahan, D. (1990). Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *PNAS USA* **87**, 4645-4649.
- Grant, S.R., Fisher, E.J., Chang, J.H., Mole, B.M. and Dangl, J.L. (2006b). Subterfuge and manipulation: type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **60**, 425-449.
- Gutierrez, M.G., Master, S.S., Singh, S.B., Taylor, G.A., Colombo, M.I. and Deretic, V. (2004). Autophagy Is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages. *Cell* **119**, 753-766.
- Hanada, K., Tamai, M., Yamagishi, M., Ohmura, S., Sawada, J. and Tanaka, I. (1978). Isolation and characterization of E-64, a new thiol protease inhibitor. *Agric. Biological Chem.* **42**, 523-528.
- Hayward, A.P., Tsao, J. and Dinesh-Kumar, S.P. (2009). Autophagy and plant innate immunity: Defense through degradation. *Semin. Cell Dev. Biol.* **20**, 1041-1047.
- He, C. and Klionsky, D.J. (2009). Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu. Rev. Genet.* **43**, 67-93.
- He, C. and Levine, B. (2010). The Beclin1 interactome. *Curr. Opin. Cell Biol.* **22**, 140-149.
- Hemetsberger, C., Herrberger, C., Zechmann, B., Hillmer, M. and Doehlemann, G. (2012). The *Ustilago maydis* Effector Pep1 Suppresses Plant Immunity by Inhibition of Host Peroxidase Activity. *Plos Pathog.* **8**.
- Hoffman, C.S. and Winston, F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *E. coli*. *Gene* **57**, 267-272.
- Holliday, R. (1974). *Ustilago maydis*. In King, R. C. (ed.) *Handbook of Genetics I*, Plenum Press, New York/USA, 575-595.
- Huffaker, A., Pearce, G. and Ryan, C.A. (2006). An endogenous peptide signal in *Arabidopsis* activates components of the innate immune response. *PNAS USA* **103**, 10098-10103.
- Jakobek, J.L., Smith, J.A. and Lindgren, P.B. (1993). Suppression of bean defense responses by *Pseudomonas syringae*. *Plant Cell* **5**, 57-63.
- Jia, J., McAdams, S.A., Bryan, G.T., Hershey, H.P. and Valent, B. (2000). Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *EMBO* **19**, 4004-4014.
- Jones, J.D.G. and Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. *Nature* **444**, 323-329.
- Kamoun, S. (2009) The secretome of plant-associated fungi and oomycetes. In *The Mycota*, H.B. Deising (ed.). Berlin, Heidelberg, Springer, pp. 173-180.
- Kämper, J. (2004). A PCR-based system for highly efficient generation of gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Mol. Genet. Genomics* **271**, 103-110.

- Kämper, J., Kahmann, R., Boelker, M., Ma, L.-J., Brefort, T., Saville, B.J., *et al.* (2006). Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature* **444**, 97-101.
- Kämper, J., Reichmann, M., Romeis, T., Bölker, M. and Kahmann, R. (1995). Multiallelic recognition: nonself-dependent dimerization of the *bE* and *bW* homeodomain proteins in *Ustilago maydis*. *Cell* **81**, 73-83.
- Kankanala, P., Czymmek, K. and Valent, B. (2007). Roles for the rice membrane dynamics and plasmodesmata during biotrophic invasion by the blast fungus. *Plant Cell* **19**, 706-724.
- Kaschani, F., Shabab, M., Bozkurt, T., Shindo, T., Schornack, S., Gu, C., *et al.* (2010). An Effector-targeted protease contributes to defense against *Phytophthora infestans* and is under diversifying selection in natural hosts. *Plant Physiol.* **154**, 1794-1804.
- Ketelaar, T., Voss, C., Dimmock, S.A., Thumm, M. and Hussey, P.J. (2004). *Arabidopsis* homologues of the autophagy protein Atg8 are a novel family of microtubule binding preteins. *FEBS Lett.* **567**, 302-306.
- Klionsky, D.J., Cregg, J.M. and Dunn Jr., W.A. (2003). A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev. Cell* **5**, 539-545.
- Koeck, M., Hardham, A.R. and Dodds, P.N. (2011). The role of effectors of biotrophic and hemibiotrophic fungi in infection. *Cell. Microbiol.* **13**, 1849-1857.
- Koncz, C. and Schell, J. (1986). The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol. Gen. Genet.* **204**, 383-396.
- Konno, K., Hirayama, C., Nakamura, M., Tateishi, K., Tamura, Y., Hattori, M. and Kohno, K. (2003). Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex. *Plant J.* **37**, 370-378.
- Kroesen, B.J., Mesander, G., Terhaar, J.G., The, T.H. and Deleij, L. (1992). Direct visualisation and quantification of cellular cytotoxicity using two colour fluorescence. *J. Immunol. Methods* **156**, 47-54.
- Krüger, J., Thomas, C.M., Golstein, C., Dixon, M.S., Smoker, M., Tang, S., *et al.* (2002). A tomato cysteine protease required for Cf-2-dependent disease resistance and suppression of autonecrosis. *Science* **296**, 744-747.
- Kyei, G.B., Dinkins, C., Davis, A.S., Roberts, E., Singh, S.B., Dong, C., *et al.* (2009). Autophagy pathway intersects with HIV-1 biosynthesis and regulates viral yields in macrophages. *J. Cell. Biol.* **186**, 255-268.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-&.
- Lamb, C. and Dixon, R.A. (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. In *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, R.L. Jones (ed.). pp. 251-275.
- Laurie, J.D., Ali, S., Linning, R., Mannhaupt, G., Wong, P., Güldener, U., *et al.* (2012). Genome comparison of barley and maize smut fungi reveals targeted loss of RNA silencing components and species-specific presence of TEs. *Plant Cell* **24**, 1733-1745.
- Lenz, H.D. (2011). Die Rolle autophagie-assoziiierter Proteine in der pflanzlichen Immunantwort. *Dissertation*, Eberhard Karls Universität, Tübingen.
- Levine, B. and Klionsky, D.J. (2004). Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev. Cell* **6**, 463-477.
- Levine, B. and Yuan, J. (2005). Autophagy in cell death: an innocent convict? *J. Clin. Invest.* **115**, 2679-2688.
- Lewis, D.H. (1973). Concepts in fungal nutrition and origin of biotrophy. *Biol. Rev.* **48**, 261-278.
- Liang, X.H., Jackson, S., Seaman, M., Brown, K., Kempkes, B., Hibshoosh, H. and Levine, B. (1999). Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by *beclin1*. *Nature* **402**, 672-676.
- Ligoxygakis, P., Pelte, N., Hoffmann, J.A. and Reichhart, J.-M. (2002). Activation of *Drosophila* Toll during fungal infection by a blood serine protease. *Science* **297**, 114-116.
- Liu, Y., Schiff, M., Czymmek, K., Talloczy, Z., Levine, B. and Dinesh-Kumar, S.P. (2005). Autophagy regulates programmed cell death during the plant innate immune response. *Cell* **121**, 567-577.

- Ma, W., Dong, F.F.T., Stavrinides, J. and Guttman, D.S. (2006). Type III effector diversification via both pathoadaptation and horizontal transfer in response to a coevolutionary arms race. *Plos. Genet.* **2**, 2131-2142.
- Mackey, D., Holt, B.F., Wiig, A. and Dangl, J.L. (2002). RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1-mediated disease resistance in *Arabidopsis*. *Cell* **108**, 743-754.
- Martinon, F. and Tschopp, J. (2005). NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens. *Tr. Immunol.* **26**, 447-454.
- Matile, P.H. and Winkensbach, F. (1971). Function of lysosomes and lysosomal enzymes in the senescing corolla of the Morning Glory. *J. Exp. Bot.* **22**, 759-771.
- Mendoza-Mendoza, A., Berndt, P., Djamei, A., Weise, C., Linne, U., Marahiel, M., *et al.* (2009). Physical-chemical plant- derived signals induce differentiation in *Ustilago maydis*. *Mol. Microbiol.* **71**, 895-911.
- Mentlak, T.A., Kombrink, A., Shinya, T., Ryder, L.S., Otomo, I., Saitoh, H., *et al.* (2012). Effector-mediated suppression of chitin-triggered immunity by *Magnaporthe oryzae* is necessary for rice blast disease. *Plant Cell* **24**, 322-335.
- Mitou, G., Budak, H. and Gozuacik, D. (2009). Techniques to Study Autophagy in Plants. *Int. J. Plant Genomics* **2009**.
- Müller, A.N., Ziemann, S., Treitschke, S., Aßmann, D. and Doehlemann, G. (2013). Compatibility in the maize - *Ustilago maydis* interaction requires inhibition of host cysteine proteases by the fungal effector Pit2. *Plos Pathog.* **9**, 1-13.
- Müller, O., Kahmann, R., Aguilar, G., Trejo-Aguilar, B. and Wu, A. (2008). The secretome of the maize pathogen *Ustilago maydis*. *Fungal Genet. Biol.* **45**, 63-70.
- Nair, U. and Klionsky, D.J. (2005). Molecular mechanisms and regulation of specific and nonspecific autophagy pathways in yeast. *J. Biol. Chem.* **280**, 41785-41788.
- Navarre, D.A. and Wolpert, T.J. (1999). Victorin induction of an apoptotic/senescence-like response in oats. *Plant Cell* **11**, 237-249.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. and vonHeijne, G. (1997). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng.* **10**, 1-6.
- Nürnberg, T., Brunner, F., Kemmerling, B. and Piater, L. (2004). Innate immunity in plants and animals, striking similarities and obvious differences. *Immunol. Rev.* **198**, 249-266.
- O'Connell, R.J. and Panstruga, R. (2006). Tete a tete inside a plant cell: establishing compatibility between plants and biotrophic fungi and oomycetes. *New Phytol.* **171**, 699-718.
- Oberstein, A., Jeffrey, P.D. and Shi, Y. (2007). Crystal structure of the Bcl-XL-Becclin1 peptide complex: Becclin1 is a novel BH3-only Protein. *J. Biol. Chem.* **282**, 13123-13132.
- Ogawa, M., Yoshimori, T., Suzuki, T., Sagara, H., Mizushima, N. and Sasakawa, C. (2005). Escape of intracellular Shigella from autophagy. *Science* **307**, 727-731.
- Panstruga, R. and Dodds, P.N. (2009). Terrific protein traffic: the mystery of effector protein delivery by filamentous plant pathogens. *Science* **324**, 748-750.
- Patel, S. and Dinesh-Kumar, S.P. (2008). *Arabidopsis* ATG6 is required to limit the pathogen-associated cell death response. *Autophagy* **4**, 20-27.
- Pearce, G., Yamaguchi, Y., Barona, G. and Ryan, C.A. (2010). A subtilisin-like protein from soybean contains an embedded, cryptic signal that activates defense-related genes. *PNAS USA* **107**, 14921-14925.
- Pechan, T., Ye, L., Chang, Y., Mitra, A., Lin, L., Davis, F.D., *et al.* (2000). A unique 33-kD cysteine proteinase accumulates in response to larval feeding in maize genotypes resistant to fall armyworm and other Lepidoptera. *Plant Cell* **12**, 1031-1040.
- Perez-de-Luque, A., Lozano, M.D., Moreno, M.T., Testillano, P.S. and Rubiales, D. (2007). Resistance to broomrape (*Orobanche crenata*) in faba bean (*Vicia faba*): cell wall changes associated with prehaustorial defensive mechanisms. *Ann. Appl. Biol.* **151**, 89-98.
- Perez-de-Luque, A., Moreno, M.T. and Rubiales, D. (2008). Host plant resistance against broomrapes (*Orobanche* spp.): defence reactions and mechanisms of resistance. *Ann. Appl. Biol.* **152**, 131-141.

- Rawlings, N.D., Barrett, A.J. and Bateman, A.** (2011). MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res.* **40**.
- Rooney, H.C., van't Klooster, J.W., van der Hoorn, R.A., Joosten, M.H., Jones, J.D. and de Wit, P.J.** (2005). *Cladosporium* Avr2 inhibits tomato Rcr3 protease required for Cf-2-dependent disease resistance. *Science* **308**, 1783-1786.
- Rowell, J.B.** (1955). Functional role of compatibility factors and an in vitro test for sexual compatibility with haploid lines of *Ustilago zeae*. *Phytopathol.* **45**, 370-374.
- Ryerson, D.E. and Heath, M.C.** (1996). Cleavage of nuclear DNA into oligonucleosomal fragments during cell death induced by fungal infection or abiotic treatments. *Plant Cell* **8**, 393-402.
- Sambrook, J., Frisch, E.F. and Maniatis, T.** (1989). Molecular Cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbour, New York.
- Schirawski, J., Böhnert, H.U., Steinberg, G., Snetselaar, K., Adamikowa, L. and Kahmann, R.** (2005). Endoplasmic reticulum glucosidase II is required for pathogenicity of *Ustilago maydis*. *Plant Cell* **17**, 3532-3543.
- Schirawski, J., Mannhaupt, G., Münch, K., Brefort, T., Schipper, K., Doehlemann, G., et al.** (2010). Pathogenicity determinants in smut fungi revealed by genome comparison. *Science* **330**, 1546-1548.
- Schulz, B., Banuett, F., Dahl, M., Schlesinger, R., Schafer, W., Martin, T., et al.** (1990). The b alleles of *Ustilago maydis*, whose combinations program pathogenic development, code for polypeptides containing a homeodomain-related motif. *Cell* **60**, 295-306.
- Scott, R.C., Juhasz, G. and Neufeld, T.P.** (2007). Direct induction of autophagy by Atg1 inhibits cell growth and induces apoptotic cell death. *Curr. Biol.* **17**, 1-11.
- Seay, M., Patel, S. and Dinesh-Kumar, S.P.** (2006). Autophagy and plant innate immunity. *Cell. Microbiol.* **8**, 899-906.
- Shindo, T. and Van Der Hoorn, R.A.L.** (2008). Papain-like cysteine proteases: key players at molecular battlefields employed by both plants and their invaders. *Mol. Plant Pathol.* **9**, 119-125.
- Shintani, T. and Klionsky, D.J.** (2004). Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science* **306**, 990-995.
- Skibbe, D., Doehlemann, G., Fernandes, J. and Walbot, V.** (2010). Maize tumors caused by *Ustilago maydis* require organ-specific genes in host and pathogen. *Science* **328**, 89-92.
- Snetselaar, K.M., Boelker, M. and Kahmann, R.** (1996). *Ustilago maydis* mating hyphae orient their growth toward pheromone sources. *Fungal Genet. Biol.* **20**, 299-312.
- Snetselaar, K.M. and Mims, C.W.** (1992). Sporidial fusion and infection of maize seedlings by the smut fungus *Ustilago maydis*. *Mycologica* **84**, 193-203.
- Snetselaar, K.M. and Mims, C.W.** (1993). Infection of maize by *Ustilago maydis*: light and electron microscopy. *Phytopathol.* **83**, 843-850.
- Song, J., Win, J., Tian, M., Schornack, S., Kaschani, F., Ilyas, M., et al.** (2009). Apoplastic effectors secreted by two unrelated eukaryotic plant pathogens target the tomato defense protease Rcr3. *PNAS USA* **106**, 1654-1659.
- Southern, E.M.** (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503-&.
- Spellig, T., Bölker, M., Lottspeich, F., Frank, R.W. and Kahmann, R.** (1994). Pheromones trigger filamentous growth in *Ustilago maydis*. *EMBO* **13**, 1620-1627.
- Staskawicz, B.J., Ausubel, F.M., Baker, B.J., Ellis, J.G. and Jones, J.D.G.** (1995). Molecular genetics of plant disease resistance. *Science* **268**, 661-667.
- Steinberg, G. and Perez-Martin, J.** (2008). *Ustilago maydis*, a new fungal model system for cell biology. *Tr. Cell Biol.* **18**, 61-67.
- Suzuki, N.N., Yoshimoto, K., Fujioka, Y., Ohsumi, Y. and Inagaki, F.** (2005). The crystal structure of plant ATG12 and its biological implication in autophagy. *Autophagy* **1**, 119-126.
- Talbot, N.J. and Kershaw, M.J.** (2009). The emerging role of autophagy in plant pathogen attack and host defence. *Curr. Opin. Plant Biol.* **12**, 444-450.

- Talloczy, Z., Virgin, H.W.I.V. and Levine, B. (2006). PKR-dependent autophagic degradation of herpes simplex virus type 1. *Autophagy* **2**, 24-29.
- Thompson, A.R. and Vierstra, R.D. (2005). Autophagic recycling: lessons from yeast help define the process in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**, 165-173.
- Thordal-Christensen, H., Zhang, Z., Wei, Y. and Collinge, D.B. (1997). Subcellular localization of H₂O₂ in plants: H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *Plant Journal* **11**, 1187-1194.
- Tian, M., Win, J., Song, J., van der Hoorn, R.A., van der Knaap, E. and Kamoun, S. (2007). A *Phytophthora infestans* Cystatin-Like Protein Targets a Novel Tomato Papain-Like Apoplastic Protease. *Plant Physiol.* **143**, 364-377.
- Tsukuda, T., Carleton, S., Fotheringham, S. and Holloman, W.K. (1988). Isolation and characterization of an autonomously replicating sequence from *Ustilago maydis*. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 3703-3709.
- van der Biezen, E.A. and Jones, J.D.G. (1998). Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Tr. Plant Sci.* **23**, 454-456.
- van der Hoorn, R.A.L. (2008). Plant Proteases: From phenotypes to molecular mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* **59**, 191-223.
- van der Hoorn, R.A.L., de Wit, P.J.G.M. and Joosten, M.H.A.J. (2002). Balancing selection favors guarding resistance proteins. *Tr. Plant Sci.* **7**, 67-71.
- van der Hoorn, R.A.L. and Jones, J.D. (2004). The plant proteolytic machinery and its role in defence. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**, 400-407.
- van der Hoorn, R.A.L. and Kamoun, S. (2008). From Guard to Decoy: a new model for perception of plant pathogen effectors. *Plant Cell* **20**, 2009-2017.
- van der Linde, K., Hemetsberger, C., Kastner, C., Kaschani, F., van der Hoorn, R.A.L., Kumlehn, J. and Doeblemann, G. (2012). A Maize Cystatin Suppresses Host Immunity by Inhibiting Apoplastic Cysteine Proteases. *Plant Cell* **24**, 1285-1300.
- van Esse, H.P., van't Klooster, J.W., Bolton, M.D., Yadeta, K., Van-Baarlen, P., Boeren, S., *et al.* (2008). The *Cladosporium fulvum* virulence protein Avr2 inhibits host proteases required for basal defense. *Plant Cell* **20**, 1948-1963.
- van Loon, L.C., Rep, M. and Pieterse, C.M.J. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* **44**, 135-162.
- Vieira, P., Danchin, E.G.J., Neveu, C., Crozat, C., Jaubert, S. and Hussey, R.S. (2011). The plant apoplasm is an important recipient compartment for nematode secreted proteins. *J. Exp. Bot.* **62**, 1241-1253.
- Vivier, E. and Malissen, B. (2005). Innate and adaptive immunity: specificities and signaling hierarchies revisited. *Nature Immunol.* **6**, 17-21.
- Williams, B. and Dickman, M. (2008). Plant programmed cell death: can't live with it; can't live without it. *Mol. Plant Pathol.* **9**, 531-544.
- Xia, Y., Suzuki, H., Borevitz, J., Blount, J., Guo, Z., Patel, K., *et al.* (2004). An extracellular aspartic protease functions in *Arabidopsis* disease resistance signalling. *EMBO* **23**, 980-988.
- Xiang, T.T., Zong, N., Zhang, J., Chen, J.F., Chen, M.S. and Zhou, J.M. (2011). BAK1 is not a target of the *Pseudomonas syringae* effector AvrPto. *Mol. Plant Microbe Interact.* **24**, 100-107.
- Xiang, T.T., Zong, N., Zou, Y., Wu, Y., Zhang, J. and Xing, W. (2008). *Pseudomonas syringae* effector AvrPto blocks innate immunity by targeting receptor kinases. *Curr. Biol.* **18**, 74-80.
- Xie, Z. and Klionsky, D.J. (2007). Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat. Cell Biol.* **9**, 1102-1109.
- Xu, Y., Jagannath, C., Liu, X.D., Sharafkhaneh, A., Kolodziejaska, K.E. and Eissa, N.T. (2007). Toll-like receptor 4 is a sensor for autophagy associated with innate immunity. *Immunity* **27**, 135-144.

- Yamada, K., Matsushima, R., Nishimura, M. and Hara-Nishimura, I.** (2001). A slow maturation of a cysteine protease with a granulin domain in the vacuoles of senescing *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiol.* **127**, 1626-1634.
- Yoshimoto, K., Hanaoka, H., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., Noda, T. and Ohsumi, Y.** (2004). Processing of ATG8s, ubiquitin-like proteins, and their deconjugation by ATG4s are essential for plant autophagy. *Plant Cell* **16**, 2967-2983.
- Yu, L., Strandberg, L. and Lenardo, M.J.** (2008). The selectivity of autophagy and its role in cell death and survival. *Autophagy* **4**, 567-573.
- Zasloff, M.** (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **415**, 389-395.
- Zimmerman, M., Yurewicz, E. and Patel, G.** (1976). A new fluorogenic substrate for chymotrypsin. *Anal. biochem.* **70**, 258-262.
- Zimmermann, P., Hirsch-Hoffmann, M., Hennig, L. and Gruissem, W.** (2004). GENEVESTIGATOR. *Arabidopsis* microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiol.* **136**, 2621-2632.
- Zipfel, C. and Felix, G.** (2005). Plant and animal: a different taste for microbes. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**, 353-360.

6 Anhang

Danksagung

Zunächst möchte ich mich an dieser Stelle ganz herzlich bei Frau Prof. Dr. Regine Kahmann für die Möglichkeit bedanken, in einem so spannenden und herausfordernden Feld meine Arbeit anfertigen zu dürfen. Zudem bedanke ich mich für die konsequente Unterstützung und die vielen hilfreichen Ideen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Des Weiteren möchte ich den Mitgliedern meiner Prüfungskommission Herrn Prof. Dr. Alfred Batschauer, Herrn Prof. Dr. Hans-Ulrich Mösch und Herrn Prof. Dr. Martin Thanbichler danken. Martin Thanbichler möchte ich außerdem für die Übernahme des Zweitgutachtens danken.

Für die gute Betreuung und die lebhaften Diskussionen, während meiner Komitee-Treffen möchte ich mich bei den Mitgliedern meines IMPRS „Thesis Advisory Committee“, Herrn Prof. Dr. Erhard Bremer, Herrn Prof. Dr. Hans-Ulrich Mösch und Herrn Prof. Dr. Martin Thanbichler, bedanken.

Bei den Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe möchte ich mich für die wirklich tolle Zeit im Labor bedanken. Durch euch war die Arbeit nicht nur eine Pflichtkür, sondern auch viel Spaß und Freude. Ein besonderer Dank geht hierbei an Armin Djamei, Stefanie Reissmann und Daniel Lanver, die im Labor wirklich immer einen guten Rat für mich hatten und mir durch neue Ideen und Anregungen stets zur Seite standen. Karin Münch, Nicole Rössel und Volker Vincon möchte ich für die große Hilfe, besonders in meiner Anfangszeit, und für das „Management“ im Labor bedanken.

Den „Mädels“ Franziska Rabe, Nancy Stolle und Marie Tollot möchte ich nicht nur für eine super Zeit im Labor danken, sondern viel mehr für ihre Freundschaft. Die tägliche Kaffeepause, Diskussionen, kleine Trostpflaster und vor allem die Unternehmungen außerhalb des Labors haben die Zeit meiner Doktorarbeit wirklich unvergesslich gemacht. Ihr seid spitze!

Ein Extra-Dankeschön geht an Alexander Hof für die beste Zusammenarbeit der Welt. Danke für deine Unterstützung, das Durchhaltevermögen, die vielen Diskussionen und deine Freundschaft.

Zuletzt möchte ich meinen Freunden und meiner Familie ganz herzlich danken, vor allem Mama und Papa für ihre große Unterstützung in den letzten Jahren.

Mein größter Dank gilt António, der einfach immer für mich da ist!

Lebenslauf

PERSÖNLICHE ANGABEN

Nina Neidig

Geboren am 22. April 1983 in Erbach

SCHULBILDUNG

1989 - 1993	Grundschule Bad König
1993 - 1995	Vörderstufe der Carl-Weyprecht-Schule in Bad König
1995 - 1999	Gymnasialer Zweig der Carl-Weyprecht-Schule in Bad König
1999 - 2002	Gymnasium Michelstadt

STUDIUM

2002 - 2009	Biologiestudium an der Technischen Universität in Darmstadt
2007 - 2009	Diplomarbeit an der Technischen Universität in Darmstadt Fachbereich Ökologie Titel: „Interactions of <i>Caenorhabditis elegans</i> with <i>Acanthamoeba castellanii</i> and <i>Pseudomonas fluorescens</i> ”
2009	Diplom der Biologie Hauptfächer: Ökologie, Mikrobiologie und Pflanzenphysiologie Gesamtnote „sehr gut“, mit Auszeichnung

PROMOTION

2009 - 2013	Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in Marburg unter Betreuung von Frau Prof. Dr. Regine Kahmann Titel: „Funktionelle Analyse des <i>Ustilago maydis</i> Effektorproteins Tin3 im Gencluster 19A“ Mitglied der „ <i>International Max Planck Research School</i> “ des Max-Planck-Instituts, Marburg
-------------	--